DIE CHALCONSYNTHASE ALS SCHLÜSSELENZYM DER ANTHOCYANSYNTHESE IN DAUCUS CAROTA

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

WALTER HINDERER
aus Göppingen

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536512_0018

DIE CHALCONSYNTHASE ALS SCHLÜSSELENZYM DER ANTHOCYANSYNTHESE IN *DAUCUS CAROTA*

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt von

WALTER HINDERER

aus Göppingen

1 9 8 4

Tag der mündlichen Prüfung : 23. Oktober 1984

Dekan : Prof. Dr. H. U. Seitz

1. Berichterstatter : Prof. Dr. H. U. Seitz

2. Berichterstatter : Prof. Dr. R. Hampp

INHALTSVERZEICHNIS Seite

I.	EINLEITUNG	1
1.	Gewebekulturen von *Daucus carota*, ein geeignetes System für Untersuchungen zur Regulation des Flavonoid-Stoffwechsels	1
2.	Wirkung von GA_3 auf die Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels in *Daucus carota* Gewebekulturen	2
3.	Die Synthese von Anthocyan, ein hormonell gesteuerter Differenzierungsprozess	8
4.	Die Rolle der Gibberelline in Höheren Pflanzen	11
5.	Die Chalconsynthase, das Schlüsselenzym des Flavonoid-Stoffwechsels	13
6.	Problemstellung	18
II.	MATERIAL UND METHODEN	20
1.	Versuchsobjekte	20
1.1.	Wilde Möhre	20
1.2.	Gewebekulturen	20
1.2.1.	Kalluskulturen	20
1.2.2.	Suspensionskulturen	21
2.	Wachstumsmessungen	22
2.1.	Frischgewicht	22
2.2.	Trockengewicht	22
3.	Bestimmung des Anthocyangehalts	22
4.	Analyse freier Aminosäuren	22
4.1.	Extraktion freier Aminosäuren	22
4.2.	Trennung und Quantifizierung der freien Aminosäuren	23
5.	Herstellung von Enzymrohextrakten für Routinemessungen	24
5.1.	Enzymrohextrakte aus Blütenmaterial	24

5.1.1.	Aufarbeitung für die Messung der CHS-Aktivität	24
5.1.2.	Aufarbeitung für die Messung der PAL-Aktivität	25
5.1.3.	Aufarbeitung für die Messung der CHI-Aktivität	25
5.2.	Enzymrohextrakte aus Suspensionszellen	25
5.2.1.	Aufarbeitung für die Messung der PAL-, CHS-, CHI- und G6PDH-Aktivitäten	25
5.2.2.	Aufarbeitung für die Messung der 3'-Nucleotidase-Aktivität	26
6.	Bestimmung der Enzymaktivitäten	26
6.1.	Chalconsynthase	26
6.1.1.	Standard Testbedingungen	27
6.1.2.	Direkte Methode	27
6.1.3.	Identifizierung und quantitative Bestimmung der Flavanone	28
6.1.4.	Abweichungen vom Standard-Test	30
6.2.	Chalconisomerase (EC. 5.5.1.6.)	31
6.3.	Phenylalanin Ammonium-Lyase (EC. 4.3.1.5.)	31
6.4.	Glucose 6-phosphat-Dehydrogenase (EC. 1.1.1.49.)	31
6.5.	3'-Nucleotidase (EC. 3.1.3.6.)	31
7.	Proteinbestimmung	32
8.	Reinigung der Chalconsynthase	32
8.1.	Dowex-Überstand	32
8.2.	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	33
8.3.	Entsalzung mit Sephadex G-25	33
8.4.	Chromatographie an Ionenaustauschern	34
8.4.1.	Vorversuche	34
8.4.2.	DEAE-Sephacel	34
8.4.3.	Mono Q	35
8.5.	Nachweis von CHS-Protein und Bestimmung des Molekulargewichts der CHS-Untereinheit	35
9.	Reinigung der 3'-Nucleotidase	36

9.1.	Reinigung auf Hemmwirkung im CHS-Test	36
9.2.	Reinigung auf Phosphatase-Aktivität	37
10.	In vivo-Versuche mit Suspensionskulturen	37
10.1.	Versuche mit Gibberellinsäure	37
10.2.	Supplementationsversuche	38
10.3.	Versuche mit L-AOPP	38
10.4.	Versuche mit Lanthanchlorid	39
10.5.	Versuche mit Ca^{2+}-Ionophor A 23 187	39
10.6.	Phosphat- und Nitratmangel	39
11.	Versuche zum Nachweis der Enzyme des Anthocyanstoffwechsels in gereinigten Vakuolenpräparationen	40
12.	Synthese von Enzymsubstraten und Derivaten	41
12.1.	Synthese von 4-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA	41
12.2.	Synthese von Naringeninchalcon	42
12.3.	Synthese von 3'-Dephospho-4-Cumaroyl-CoA und 3'-Dephospho-Malonyl-CoA	45
12.4.	Synthese von 4-Cumaroyl-4'-Phosphopantethein und Malonyl 4'-Phosphopantethein	46
13.	Verbrauchsmaterial und Chemikalien	48
13.1.	Verbrauchsmaterial	48
13.2.	Chemikalien	49
14.	Abkürzungen	50
III.	ERGEBNISSE	53
1.	Enzyme des Anthocyanstoffwechsels in Blüten der Wilden Möhre	53
1.1.	Das Versuchsobjekt	53
1.2.	Vergleich der Enzymaktivitäten PAL, CHS und CHI aus violetten und weißen Blüten	53
1.3.	Eigenschaften der CHS aus Blüten	55
2.	In vivo-Versuche mit Suspensionskulturen	60

2.1.	Charakterisierung der anthocyan-produzierenden Suspensionskultur	60
2.2.	Versuche mit Gibberellinsäure	62
2.2.1.	Wirkung über die gesamte Kultur-periode	62
2.2.2.	Supplementationsexperimente	65
2.2.3.	Schnelle Wirkung	68
2.3.	Wirkung von L-AOPP	74
2.4.	Einfluß von GA_3 und L-AOPP auf die freien Aminosäuren	78
2.4.1.	Wirkung von GA_3	78
2.4.2.	Wirkung von L-AOPP	83
2.5.	Störung des Ca^{2+}-Stoffwechsels der Zellen	86
2.5.1.	Versuche mit Lanthanchlorid	86
2.5.2.	Versuche mit Ca^{2+}-Ionophor A 23 187	88
2.6.	Versuche zur Steigerung der Anthocyan-produktion	90
2.6.1.	Phosphatmangel	91
2.6.2.	Nitratmangel	94
3.	In vitro Versuche I: Teilweise Reinigung und Charakterisierung der CHS aus Suspensionskulturen	95
3.1.	Reinigung der CHS	95
3.1.1.	Stabilität der CHS	95
3.1.2.	Vorversuche mit DEAE-Sephacel	97
3.1.3.	Die Reinigungsprozedur	99
3.1.4.	FPLC	101
3.2.	Charakterisierung der CHS	103
3.2.1.	Eigenschaften des Standardtests, Vergleich der beiden Methoden zur CHS-Aktivitätsbestimmung	103
3.2.2.	Reaktionskinetik und Protein-abhängigkeit	105
3.2.3.	Einfluß von 2-Mercaptoethanol und BSA	106
3.2.4.	Abhängigkeit vom pH-Wert	110
3.2.5.	Substratspezifität	113
3.2.6.	Einfluß verschiedener Phenylpropane auf die CHS-Reaktion	115

4.	In vitro-Versuche II: Teilweise Reinigung und Charakterisierung der Hemmaktivität aus Suspensionskulturen	119
4.1.	Reinigung der Hemmaktivität	119
4.2.	Molekulare Grundlagen der Hemmung, Identifizierung des "Inhibitors" als 3'-Nucleotidase	123
4.2.1.	Wirkung der Hemmaktivität auf die CHS-Substrate	123
4.2.2.	Charakterisierung der 3'-Nucleotidase aus *Daucus carota*	126
4.2.3.	Hemmung der CHS mit 3'-Nucleotidase aus *Lolium multiflorum* und mit CoA-Derivaten	129
4.3.	Versuche zur Trennung der 3'-Nucleotidase von anderen Monophosphatasen und von der CHS	133
5.	Nachweis von CHS-Protein mit der PAP-Methode	139
6.	Nachweis von CHS-Aktivität in Präparationen isolierter Vakuolen	141
IV.	DISKUSSION	
1.	Kompartimentierung des Anthocyanstoffwechsels	145
2.	Die Hydroxylierung des B-Rings von Cyanidin in *Daucus carota*	148
3.	In vitro-Eigenschaften der CHS aus *Daucus carota*	150
4.	Die Regulation der CHS in *Daucus carota*	153
5.	Zur Wirkung der Gibberellinsäure	161
6.	Vorkommen und Bedeutung der 3'-Nucleotidase in Höheren Pflanzen	165
V.	ZUSAMMENFASSUNG	168
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	173

I EINLEITUNG

1. Gewebekulturen von *Daucus carota*, ein geeignetes System für Untersuchungen zur Regulation des Flavonoid-Stoffwechsels

Gewebekulturen, insbesondere Suspensionskulturen, sind bestens geeignet für Untersuchungen von Stoffwechselwegen und der Regulation der beteiligten Enzyme. Suspensionskulturen besitzen dabei folgende Vorteile:
Das Versuchsmaterial wird unter sterilen Bedingungen mit definierten Nährmedien kultiviert. Die Zugabe von Wirkstoffen (Isotope, Antibiotika, Vorstufen etc.) ist durch die Verwendung flüssiger Nährlösungen sehr einfach. Durch die große Oberfläche der Suspensionskultur erfolgt, im Vergleich zu intakten Geweben, eine raschere Aufnahme der Metaboliten, eine wichtige Voraussetzung für Fütterungsexperimente. Das exponentielle Wachstum der Zellkultur liefert in kurzer Zeit genügend Material, um z.B. Enzyme in ausreichenden Mengen zu isolieren.
Für die Aufklärung physiologischer Vorgänge bei der Cytodifferenzierung sind Gewebekulturen gute Modellsysteme. Hormonell gesteuerte Differenzierungsprozesse können durch Änderung der Phytohormonzusammensetzung des Mediums ausgelöst werden. Man kann in Kalluskulturen meist problemlos Wurzelbildung induzieren, vielfach auch Sproßbildung, im Idealfall also eine intakte Pflanze regenerieren.
Trotzdem sind Gewebekulturen "in vitro"-Kulturen; inwieweit Ergebnisse auf die natürliche Situation der Pflanze übertragbar sind, muß in jedem einzelnen Fall überprüft werden, dies gilt auch für den Bereich des Sekundärstoffwechsels.

Die für diese Arbeit benutzten Gewebekulturen von *Daucus carota* ergeben in dieser Hinsicht ideale Verhältnisse. Die Kulturen produzieren in großen Mengen Anthocyan (ALFERMANN und REINHARD 1971). SCHMITZ und SEITZ (1972) isolierten zwei verschiedene Anthocyane, beides Glycoside des Cyanidins. Als Zuckerkomponenten wurden Glucose und

Xylose identifiziert. HEMINGSON und COLLINS (1982) berichteten über vier Cyanidinglycoside mit Glucose und Galactose als Zuckerbestandteile. In jüngster Zeit identifizierte HARBORNE (1983) das (Haupt-) Anthocyan als Cyanidin 3-(sinapoyl-xylosyl-glucosyl-galactosid). Dasselbe Pigment wurde auch in Blüten und Wurzeln der Karotte und anderen Doldenblütlern (Apiaceae) nachgewiesen (HARBORNE 1976). Es konnte also gezeigt werden, daß die Gewebekulturen von *Daucus carota* ein Anthocyan akkumulieren, welches auch in der intakten Pflanze vorkommt. Als weiterer Vorteil der Gewebekulturen kommt hinzu, daß Cyanidin das einzige nachweisbare Flavonoid darstellt (BECKER, persönliche Mitteilung). Die Anthocyanakkumulation ist lichtunabhängig (ALFERMANN und REINHARD 1971). Damit erfährt das System eine weitere Vereinfachung: Da die Kultivierung unter Dauerdunkelbedingungen erfolgt, kann eine Beteiligung des Phytochromsystems an der Regulation der Anthocyansynthese, wie für viele Systeme nachgewiesen (MANCINELLI 1983), vernachlässigt werden.
Durch Gabe von Gibberellinsäure (GA_3) ins Kulturmedium (0,3 µM) wurde die Anthocyansynthese in Kalluskulturen vollständig blockiert (SCHMITZ und SEITZ 1972), daraus resultierte eine anthocyanfreie Zellinie (DC_w). Mit der Umstellung des Stoffwechsels durch GA_3, hatte man möglicherweise ein Regulationsprinzip entdeckt, welches auch bei der Differenzierung der Pflanze in pigmentierte und farblose Zellen eine Rolle spielen könnte.

2. Wirkung von GA_3 auf die Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels in *Daucus carota* Gewebekulturen

Mit "allgemeinem Phenylpropanstoffwechsel" bezeichnet man diejenigen Reaktionen, die ausgehend von L-Phenylalanin zu den aktivierten Zimtsäuren (Cinnamoyl-CoA) führen (GRISEBACH 1977). Diese Zimtsäure-CoA-Thioester sind allerdings nicht als Endprodukte des allgemeinen Phenylpropanstoff-

wechsels zu verstehen, sondern vielmehr als Vorstufen für die Biosynthese anderer Phenylpropane. Wenn Zimtsäuren akkumuliert werden, geschieht dies entweder in Form von Chinasäureester (Chlorogensäuren) oder Glycosiden (GROSS 1981). Die Substitutionen am aromatischen Ring der t-Zimtsäure erfolgen im "Hydroxyzimtsäure-Weg" (GROSS 1981), vor der Aktivierung durch CoA durch Hydroxylierungs- und Methylierungsschritte (in 3- und 5-Position). In einem Fall wurde auch Hydroxylierung auf der Cinnamoyl-CoA-Stufe nachgewiesen (KAMSTEEG et al. 1981).

Direkt an den allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel schließen sich die Biosynthesen von Lignin, Flavonoiden, Stilbenen, Benzoesäuren, Chlorogensäuren u.a. phenolischer Verbindungen an. Das Lignin ist der bedeutenste Vertreter der Phenylpropane. Die Biosynthese erfolgt über Reduktion der Zimtsäure-CoA-Thioester zu Alkoholen und anschließender Polymerisation durch zellwandgebundene Peroxidasen. Das Angiospermen-Lignin wird überwiegend aus Sinapinsäure gebildet (GRISEBACH 1977). Die Enzyme der Lignin-Synthese wurden auch in Zellkulturen nachgewiesen (GRISEBACH 1981).

Die Chlorogensäure gehört zu den am weitesten verbreiteten Phenylpropanen (BOUDET 1981). Sie wird durch Veresterung von Caffeoyl-CoA mit Chinasäure gebildet (STÖCKIGT und ZENK 1974).

Die Flavonoide sind hinsichtlich ihrer Genetik und Enzymologie, aber auch hinsichtlich ihrer Funktion für die Pflanze, die am besten charakterisierte Klasse pflanzlicher Sekundärstoffe (BARZ und WIERMANN 1982). An der Bildung des C_{15}-Flavonoid-Grundgerüstes sind ebenfalls Cinnamoyl-CoA-Verbindungen beteiligt. Angelagert wird ein zweiter aromatischer Ring (A), der aus drei Acetateinheiten synthetisiert wird. Diese Acetatgruppen stammen, in Analogie zur Fettsäuresynthese, aus Malonyl-CoA, durch Decarboxylierung und CoA-Abspaltung gebildet (KREUZALER und HAHLBROCK 1972). Das Malonyl-CoA wird durch Carboxylierung von Acetyl-CoA zur Verfügung gestellt (EBEL und HAHLBROCK 1977).

Die Einteilung der Flavonoide erfolgt nach dem Oxidations-

zustand des Heterozyklus. Man unterscheidet Chalcone, Flavanone, Flavone, Dihydroflavonole, Flavonole und Anthocyanidine, die sich alle, chemisch gesehen, vom Flavangerüst ableiten (Abb. 1).

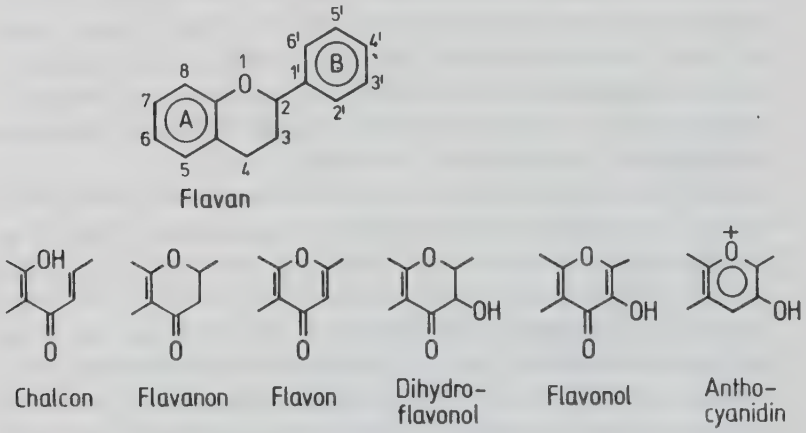


Abb. 1 Das Flavangrundgerüst und die wichtigsten Flavonoid-Klassen

Die Mannigfaltigkeit innerhalb dieser Flavonoid-Klassen kommt durch verschiedene Substitutionsmuster zustande. Hydroxylierung und Methylierung an B- und A-Ring, sowie Glycosidierungen an unterschiedlichen Stellen mit unterschiedlichen Zuckern, führen zu einer Vielzahl von Flavonoid-Glycosiden. Auch Acylierungen mit Zimtsäuren, wie im Falle des Anthocyans der Karotte (HARBORNE 1976 und 1983) oder mit Malonsäure, wie im Falle der Flavonol-Glycoside der Petersilie (MATERN 1981), sind sehr häufig. Die Aufklärung der einzelnen Schritte des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels und des Flavonoid-Glycosid-Stoffwechsels gelang einerseits durch biochemische Untersuchungen mit isolierten Enzymen, hier waren in erster Linie Arbeitsgruppen um Grisebach und Hahlbrock (Freiburg) beteiligt, aber andererseits auch durch chemogenetische Untersuchungen und Supplementationsexperimente mit definierten

Mutanten (SEYFFERT 1982). Die Enzyme des Anthocyanstoffwechsels sind, bis auf eine Ausnahme, allesamt isoliert und charakterisiert worden. Die Enzyme des Flavonoid-Glycosid-Stoffwechsels der Petersilie wurden von Hahlbrock und Mitarbeitern, auf Grund von unterschiedlichem Verhalten in Zellkulturen bei Induktion durch Licht, Verdünnung und Elicitorenbehandlung, in zwei Gruppen eingeteilt. Die Enzyme innerhalb einer Gruppe verhalten sich koordiniert (HAHLBROCK et al. 1976, HAHLBROCK 1977, EBEL und HAHLBROCK 1977, HELLER et al. 1979, HAHLBROCK et al. 1981). Zur Gruppe I gehören die Enzyme des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels: Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL), Zimtsäure 4-Hydroylase (CAH) und die Hydroxyzimtsäure : CoA-Ligase (CCL). Zur Gruppe II gehören die Enzyme des Flavonoid-Glycosid-Stoffwechsels: Chalconsynthase (CHS), Chalconisomerase (CHI) und 11 weitere Enzyme.

Auch in unserer Arbeitsgruppe wurden die Enzyme des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels untersucht, vor allem unter dem Gesichtspunkt einer möglichen Regulation durch GA_3.

Es hatte sich gezeigt, daß die Hemmung der Anthocyansynthese dosisabhängig war, mit einer 50 % - Hemmung bei 10 µM GA_3. Das Wachstum wurde durch GA_3 nicht beeinflußt (SCHMITZ und SEITZ 1972). GA_3 blockierte den Einbau von ^{14}C-Phenylalanin in Anthocyan (LÄCHELE et al. 1974). In den Folgearbeiten stand das Eingangsenzym dieses Stoffwechselweges, die PAL, im Vordergrund des Interesses. Man fand eine auf 15 % reduzierte PAL-Aktivität in DC_w-Kulturen (HEINZMANN und SEITZ 1974), die auf reduzierte Synthese der PAL zurückzuführen war. Es wurde aber auch in DC_w-Kulturen PAL-Synthese nachgewiesen (HEINZMANN und SEITZ 1977). Weitere Fütterungsexperimente (BRAUN und SEITZ 1975) mit ^{14}C-Phenylalanin bei Kalluskulturen hatten gezeigt, daß in der Mitte der Kulturperiode (21 d) der Einbau überwiegend in Kaffeesäure erfolgt; zeitlich korreliert mit dem Maximum der PAL-Aktivität. Bei DC_w-Kulturen erfolgt zusätzlicher Einbau in

Ferulasäure. Am Ende der Kulturperiode (35 d) erfolgt dagegen Einbau in Chlorogensäure (nur DC_w). Daraus wurde geschlossen: a) Die reduzierte PAL-Aktivität kann nicht die Ursache für die Hemmung der Anthocyansynthese durch GA_3 sein, b) Kaffeesäure ist eine mögliche Vorstufe von Anthocyan (DC_b) und Chlorogensäure (DC_w). Der Einfluß der Zimtsäuren auf die PAL-Aktivität in vivo und in vitro wurde mit Suspensionskulturen untersucht. Die PAL konnte in vitro durch t-Zimtsäure gehemmt werden, allerdings erst bei Konzentrationen, die in vivo bereits toxisch wirkten (NOÉ et al. 1980, NOÉ und SEITZ 1983a).
Die Zimtsäure 4-Hydroxylase (CAH) wurde in Kallus- und Suspensionskulturen nachgewiesen (HEINZMANN 1976, NOÉ und SEITZ 1982). Für die Hydroxyzimtsäure : CoA-Ligase wurden von HEINZMANN et al. (1977) Isoenzyme gefunden, wobei unter GA_3 (DC_w) ein Isoenzym fehlte. In späteren Untersuchungen konnten allerdings weder Isoenzyme noch wesentliche Unterschiede zwischen den Enzymen aus DC_b und DC_w nachgewiesen werden (RAMMENSEE 1981). Die Aktivitäten der CAH und CCL sind unter GA_3 in ähnlicher Weise reduziert wie die der PAL (HEINZMANN 1976, HEINZMANN et al. 1977, RAMMENSEE 1981).

Die Hydroxyzimtsäure-CoA : Chinasäuretransferase (CQT), ein Enzym das die Veresterung von Kaffeesäure (aus Caffeoyl-CoA) mit Chinasäure katalysiert, wurde in Kalluskulturen nachgewiesen und war nicht beeinflußt von GA_3 (SEITZ, unveröffentlicht).
Auch einige Enzyme der Gruppe II wurden untersucht. Die Chalconsynthase (CHS) war in DC_w-Kulturen nicht nachweisbar (HINDERER 1982), das Folgeenzym, die Chalconisomerase (CHI) war in der Aktivität erheblich reduziert (HEINZMANN 1976, HINDERER 1982). Die Cyanidin 3-O-Glucosyltransferase (CGT) wurde in Suspensionskulturen nachgewiesen (PETERSEN 1983). Die Enzymaktivität war unter GA_3-Einfluß nicht reduziert. Erste Supplementationsexperimente mit Flavanonen demonstrierten indirekt die Aktivität der Folgeenzyme von CHS und CHI in GA_3-behandelten Kulturen.
Die entscheidende Enzymaktivität bei der Regulation der

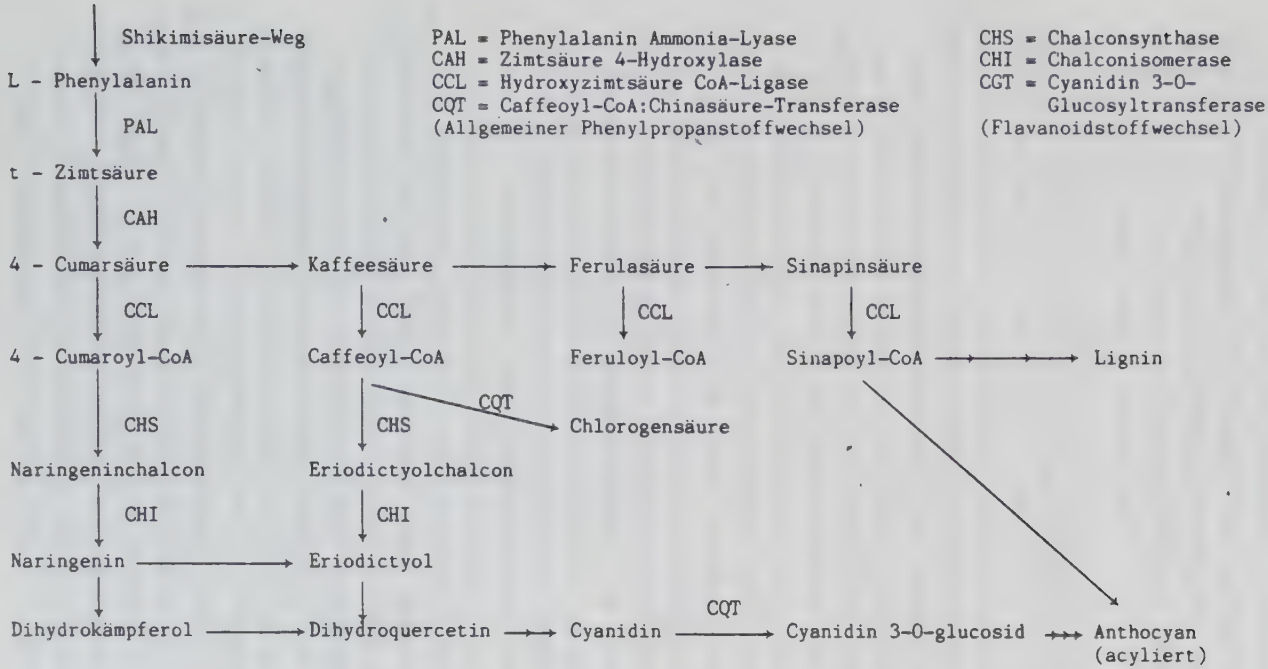


Abb. 2 Hypothetisches Schema des Phenylpropanstoffwechsels in Gewebekulturren von *Daucus carota* mit den bisher nachgewiesenen Enzymen. In Anlehnung an GRISEBACH (1977) und SEYFFERT (1982).

Anthocyansynthese durch GA_3 ist die CHS (HINDERER 1982). Abb. 2 gibt einen Überblick des Phenylpropanstoffwechsels in *Daucus carota* Gewebekulturen, wie er sich nach bisherigen Erkenntnissen darstellt.

3. Die Synthese von Anthocyan, ein hormonell gesteuerter Differenzierungsprozess

Neben den Carotinoiden sind Anthocyane und andere Flavonoide die wichtigsten Pigmente der Pflanze. Die Anthocyane sind verantwortlich für rote, blaue und violette Färbungen in Blüten, Blättern, Früchten, Wurzeln und anderen Organen. Die Synthese der Anthocyane und anderer Flavonoide ist eng verknüpft mit cytologischen, histologischen und morphologischen Wachstumsprozessen derjenigen Organe,in denen die Pigmente letztlich akkumulieren (BARZ und WIERMANN 1982). Der gesamte Sekundärstoffwechsel ist integriert in das Entwicklungsprogramm der Pflanze (WIERMANN 1981). Die Anthocyansynthese erfolgt nur in bestimmten Zellschichten. Sie ist nicht nur räumlich sondern auch zeitlich begrenzt. Die Bildung der Anthocyane kann sowohl am Anfang (z.B. Jugendanthocyan in Keimlingen), als auch am Ende (z.B. in Blüten) des Entwicklungsprozesses stattfinden.

Wie wird diese Differenzierung gesteuert ?

Die Synthese von Anthocyan wird in vielen Fällen durch Licht induziert, dabei wurde oft eine Beteiligung des Phytochromsystems nachgewiesen (MANCINELLI 1983). Im Falle der Gewebekulturen von *Daucus carota* erfolgt die Anthocyansynthese auch im Dunkeln (ALFERMANN und REINHARD 1971), gleiches wurde berichtet über Kulturen von *Vitis* (YAMAKAWA et al. 1983).

Im Verlauf vorangegangener Arbeiten wurde festgestellt, daß sowohl Kallus- als auch Suspensionszellen von *Daucus carota* heterogen pigmentiert sind. Neben anthocyanhaltigen Zellen ist eine große Zahl der Zellen völlig farblos. Auch durch Subkultivierung stark pigmentierter Kallus-Bereiche konnte nie eine homogen pigmentierte Kultur gewonnen werden

(HINDERER 1982). Die gleiche Beobachtung machten HARBORNE (1983) und DOUGALL et al. (1980). Letztere kamen durch Analysen mit verschiedenen Klonen von *Daucus carota* zu dem Ergebnis, daß die Heterogenität der Pigmentierung nicht durch Mutationen erklärt werden kann.
Diese heterogene Pigmentierung ist auch innerhalb des Blütenstandes der heimischen Wilden Möhre (*Daucus carota*) zu beobachten. Im Zentrum der Dolde befindet sich häufig eine von Anthocyan dunkelrot bis schwarz gefärbte Blüte oder ein Döldchen, während die übrigen Blüten weiß (selten rosa) sind. Die Ausprägung dieser "Mohrenblüte" erfolgt aber nicht obligatorisch, viele Dolden sind einheitlich weiß. Durch welche Faktoren die Ausbildung der Mohrenblüte induziert bzw. unterdrückt wird, ist unbekannt.
Mit Suspensionskulturen von *Daucus carota* wurde gezeigt, daß die Anthocyanakkumulation am Ende der Wachstumsphase erfolgt, ein Abschnitt, der durch Streckungswachstum und Vakuolisierung bei nahezu konstanter Zellzahl, charakterisiert ist (NOÉ et al. 1980). Die Anthocyansynthese ist ein Aspekt der Cytodifferenzierung am Ende der Entwicklung der Kultur. Neu etablierte Suspensionskulturen produzieren besonders viel Anthocyan, diese Fähigkeit geht im Laufe der Subkultivierung über viele Passagen verloren. Das Nachlassen der Anthocyanproduktion geht einher mit reduzierten Enzymaktivitäten (PAL, CHS, CHI) und zunehmend verstärktem Wachstum der Kultur. Bei Kalluskulturen kann dagegen durch selektives Überimpfen stark pigmentierter Bereiche, die Anthocyanproduktion stabilisiert werden (HINDERER 1982).
Eine geeignete Methode gut produzierende Zellinien zu erhalten, ist die Cryokonservierung, die auch mit anthocyanproduzierenden Suspensionskulturen von *Daucus carota* gelungen ist (DOUGALL und WHITTEN 1980, SEITZ und REINHARD, im Druck). DOUGALL et al. (1980) fanden, daß der Verlust der Fähigkeit zur Anthocyansynthese von der Zusammensetzung des Mediums abhing. Mit in Chemostaten kultivierten Suspensionszellen wurde festgestellt, daß in Kulturmedien

mit reduzierter Phosphatkonzentration und bei geringen Verdünnungen die Anthocyangehalte der Zellen beträchtlich höher waren (DOUGALL et al. 1983a). Bei pH 4,5 waren die Anthocyangehalte ebenfalls deutlich höher als bei pH 5,5 (DOUGALL et al. 1983b). Auch in Suspensionskulturen von *Catharanthus roseus* konnte die Anthocyansynthese durch Reduzieren von Phosphat und Nitrat und Erhöhung des Saccharosegehaltes des Kulturmediums beträchtlich gesteigert werden (KNOBLOCH et al. 1982).
Entsprechendes gilt auch für die bereits erwähnten Kulturen von *Vitis*. Hohe Saccharose- und niedere Phosphatkonzentrationen steigerten die Anthocyansynthese, während hohe Nitrat- und Phosphatgehalte Anthocyanbildung unterdrückten (YAMAKAWA et al. 1983).
Neben äußeren Faktoren bei der Steuerung der Differenzierung spielen auch endogene Faktoren eine wesentliche Rolle. Bei Pflanzen sind Differenzierungsprozesse durch Phytohormone reguliert. Wie schon erwähnt, sind in dieser Hinsicht Gewebekulturen ausgezeichnete Modellsysteme. Für die Regulation der Anthocyansynthese durch Phytohormone sind einige Beispiele zu nennen. In Kalluskulturen von *Daucus carota* ist für die Anthocyansynthese im Dunkeln das Vorhandensein von Auxin (2,4 D) notwendig (ALFERMANN und REINHARD 1971). SCHMITZ und SEITZ (1972) fanden die Hemmung der Anthocyansynthese durch GA_3. Bei *Spirodela* (Lemnaceae) hatte GA_3 die gleiche Wirkung (FURUYA und THIMANN 1964). In Zellkulturen von *Haplopappus gracilis* wurden neben der Hemmung der Anthocyansynthese durch GA_3 auch eine um 60 % reduzierte PAL-Aktivität beobachtet (GREGOR 1974). In Suspensionskulturen von *Vitis* wurde die Anthocyanproduktion durch hohe 2,4 D-Konzentrationen gehemmt (YAMAKAWA et al. 1983) und in Buchweizen-Kotyledonen konnte die Anthocyansynthese durch Kinetin stimuliert werden (MARGNA und VAINJÄRV 1983). Die Gewebekulturen von *Daucus carota* sind in Bezug auf Differenzierung des Anthocyanstoffwechsels ein gutes Modellsystem. Mit der Regulation durch GA_3 hat man möglicherweise das auch in der intakten Pflanze (z.B.

Blütenstand der Wilden Möhre) benutzte Prinzip für die Steuerung der Differenzierung in der Hand.

4. Die Rolle der Gibberelline in Höheren Pflanzen

Gibberelline sind weit verbreitete natürliche Inhaltsstoffe der Pflanze, die Wachstum und Differenzierung regulieren. Durch ihre hohe chemische Variabilität unterscheiden sie sich von anderen Phytohormonen. Bis heute sind 62 verschiedene Gibberelline bekannt, davon 55 in Höheren Pflanzen (Zusammenfassung bei CROZIER 1981). Das experimentell am häufigsten eingesetzte Gibberellin ist die Gibberellinsäure (GA_3). Unter der Flut von beschriebenen Wirkungen der Gibberelline, ist die Wirkung von GA_3 auf die Karyopse mit am besten untersucht.

GA_3 induziert die Synthese der α-Amylase im Gersten-Aleuron (YOMO und VARNER 1971, VARNER und HO 1975) über Aktivierung von Genen (JACOBSEN et al. 1982). Spätere Untersuchungen wiesen zwei Gruppen mit je zwei Isoenzymen der α-Amylase nach. Beide Gruppen wurden von GA_3 induziert, aber mit unterschiedlicher Kinetik (JACOBSEN et al. 1982). Auch die Sekretion der α-Amylasen und anderer Hydrolasen aus der Aleuronschicht ist abhängig von GA_3 (OBATA und SUZUKI 1976), dabei ist das ER beteiligt (OBATA 1979).

Es gibt noch andere Hinweise, daß GA_3 bei der Regulation der Transkription eine Rolle spielt. In Erbsen steigerte GA_3 sowohl die RNA-Polymerase-Aktivität (TOMI et al. 1983a) als auch die Template-Aktivität der DNA (TOMI et al. 1983b).

Gibberelline kontrollieren das Streckungswachstum der Zellen (JONES 1982). In zahlreichen Veröffentlichungen wurde auf eine Beteiligung von Gibberellinen bei der Regulation des Wasserhaushalts geschlossen. Exogenes Gibberellin erhöht die Wasseraufnahme im Gurken-Hypokotyl (KAZAMA und KATSUMI 1983), revertiert durch Wasserstreß gehemmtes Wachstum im Hypokotyl von *Brassica campestris* (BANYAL und RAI 1983) oder induziert ein Anschwellen von

Protoplasten aus Weizen (BLAKELEY et al. 1983). Erhöhtes osmotisches Potential der Zelle durch Stärkeabbau, Änderungen der Plastizität der Zellwand und Neusynthese von Zellwandmaterial sind einige Aspekte, die im Zusammenhang mit Gibberellin-induziertem Streckungswachstum genannt werden (JONES 1982).

Es gibt nur wenige Beispiele für Gibberellin-Wirkungen im Bereich des Sekundärstoffwechsels. Neben den bereits erwähnten Hemmungen der Anthocyansynthese durch GA_3 in *Spirodela* (FURUYA und THIMANN 1964), *Daucus carota* (SCHMITZ und SEITZ 1972) und *Haplopappus gracilis* (GREGOR 1974) wurde noch über eine Hemmung der Betacyansynthese in *Amaranthus caudatus* durch GA_3 berichtet (STOBART und KINSMAN 1977). Auch durch GA_3 gehemmt wurde die lichtinduzierte PAL-Aktivität in Salat-Hypokotylen (JONES 1982) und in Zellkulturen von *Haplopappus gracilis* (GREGOR 1974). Eine Steigerung der PAL-Aktivität im Licht durch GA_3 fanden REID et al. (1972) bei Mais.

Sehr gut untersucht ist die Biosynthese der Gibberelline, die vom Terpenoid-Stoffwechsel (Geranyl-geranylpyrophosphat) über Kauren zu GA_{12}-Aldehyd führt, der gemeinsamen Vorstufe aller Gibberelline (CROZIER 1981). Sämtliche Schritte sind auch in vitro nachgewiesen worden (GRAEBE 1982).

In vielen Fällen können andere Phytohormone synergistisch oder antagonistisch zu Gibberellinen wirken. Im Aleuron von Weizen hemmt Abscisinsäure die GA_3-induzierte Synthese der α-Amylase, Ethylen revertiert wiederum diesen Effekt (VARTY et al. 1983). In Haferstengeln verkürzt IAA die lag-Phase des GA_3-induzierten Wachstums (ADAMS und ROSS 1983).

Obwohl Biosynthese und Chemie der Gibberelline ausgezeichnet charakterisiert sind und obwohl einige physiologische Wirkungen sehr detailiert untersucht wurden, weiß man über Perception und Primärreaktionen nur sehr wenig (STODDART 1983). Viele neuere Daten sprechen dafür, daß auch in Pflanzen das Prinzip eines "second messengers" eine Rolle spielt. In tierischen Organismen wurden zwei solche Systeme gefunden: Cyclisches Adenosinmonophosphat

(cAMP) und Ca^{2+} (RASMUSSEN 1981). Während das cAMP in Pflanzen eine geringe Bedeutung zu haben scheint, gibt es einige Hinweise, daß Ca^{2+} die Funktion eines intrazellulären "second messengers" besitzt (MARMÉ 1982). Das Ca^{2+}-bindende Regulatorprotein Calmodulin wurde auch in Pflanzen gefunden (ANDERSON et al. 1980). Für einige Enzyme in Pflanzen konnte gezeigt werden, daß sie durch Ca^{2+}-Calmodulin reguliert werden: NAD-Kinase (ANDERSON et al. 1980), Ca^{2+}-abhängige ATPase (DIETER und MARMÉ 1981), Chinasäure : NAD-Oxidoreduktase (GRAZIANA et al. 1983). Bei der Wirkung von GA_3 auf die α-Amylase war schon länger bekannt, daß Ca^{2+} eine fördernde Wirkung besaß. Es wurde gezeigt, daß die GA_3-induzierte Sekretion der α-Amylase (Gruppe B der Isoenzyme) von Ca^{2+} abhing (JONES und JACOBSEN 1983). Durch Calmodulin-Antagonisten konnte der GA_3-Effekt selektiv gehemmt werden (OBATA et al. 1983).
Einige andere durch Phytohormone ausgelöste Prozesse wurden ebenfalls durch Calmodulin-Antagonisten gehemmt, wie z.B. die Cytokinin-induzierte Betacyansynthese in *Amaranthus* (ELLIOTT 1983) oder die IAA induzierte Längenzunahme in Weizenkoleoptilen (ELLIOTT et al. 1983). Jüngste Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe deuten daraufhin, daß auch bei der Regulation der PAL-Aktivität in Karotten-Suspensionskulturen Ca^{2+} beteiligt ist (JANNASCH 1984).

5. Die Chalconsynthase, das Schlüsselenzym des Flavonoid-Stoffwechsels

Das Schlüsselenzym des Flavonoid-Stoffwechsels (SCHRÖDER et al. 1979a), die Chalconsynthase (CHS), wurde in den letzten Jahren eingehend untersucht. Eigenschaften, Reaktionsmechanismus und Regulation des Enzyms sind ausführlich beschrieben worden. In den ersten Jahren nach deren Nachweis wurde sie als "Flavanonsynthase" bezeichnet, da unter den damaligen Testbedingungen nur Flavanon aber kein Chalcon als Produkt der Reaktion auftrat. Erst Untersuchun-

gen mit hochgereinigter CHS (HELLER und HAHLBROCK 1980) oder geänderten Testbedingungen (SÜTFELD und WIERMANN 1980), zeigten einwandfrei, daß Chalcon das eigentliche Produkt der Reaktion darstellt. Aus chemogenetischen und enzymatischen Untersuchungen mit Chalcon-akkumulierenden Mutanten wurde dies schon vorher gefordert (KUHN et al. 1978). Mit einer Chalconisomerase-freien Mutante von *Dianthus caryophyllus* konnte ebenfalls Chalconproduktion in vitro demonstriert werden (SPRIBILLE und FORKMANN 1982a).

Die CHS wurde erstmals in Petersilie-Suspensionskulturen nachgewiesen und katalysiert die Bildung des Rings A der Flavonoide aus drei Acetat-Einheiten, die durch Decarboxylierung aus Malonyl-CoA gewonnen werden. Als Starter-Molekül fungiert 4-Cumaroyl-CoA (KREUZALER und HAHLBROCK 1972). Das Produkt der Reaktion ist Naringenin-chalcon das einerseits spontan und andererseits mit Hilfe der CHI zu Naringenin umgesetzt wird (Abbildung 3).

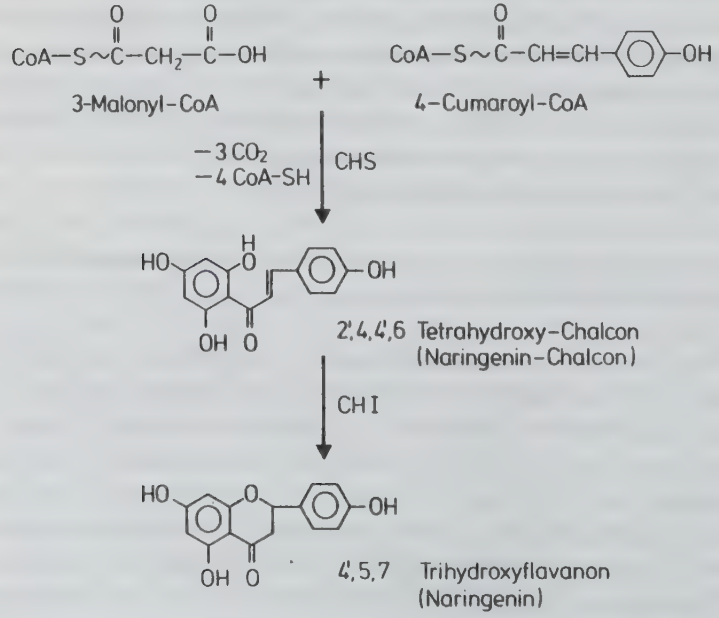


Abb. 3 Biosynthese des Flavonoid-Skeletts: Reaktion der Chalconsynthase (CHS) und Chalconisomerase (CHI)

Die CHS aus Petersilie wurde am besten charakterisiert. Sie ist ein Dimer, mit einem Molekulargewicht der Untereinheit von 42 000 (KREUZALER et al. 1979) und bekannter Aminosäure-Sequenz (REIMOLD et al. 1983). Die Synthase akzeptiert neben 4-Cumaroyl-CoA auch Caffeoyl-CoA als Substrat, allerdings mit einer geringeren Affinität (HRAZDINA et al. 1976). Die pH-Optima für Naringenin- und Eriodictyolbildung sind deutlich verschieden (SALEH et al. 1978). Das Enzym wird gehemmt durch die Endprodukte der Reaktion Naringenin (-chalcon) und CoA-SH, außerdem durch Pantethein und Acetyl-CoA, das Malonyl-CoA im Test nicht ersetzen kann (KREUZALER und HAHLBROCK 1975b). Die CHS katalysiert in vitro noch weitere Reaktionen: Malonyl-Transfer auf Pantethein (KREUZALER und HAHLBROCK 1975b), CO_2-Austausch (als Rückbildung von Malonyl-CoA zu interpretieren) und Decarboxylierung von Malonyl-CoA unter Freisetzung von Acetyl-CoA (KREUZALER et al. 1978). Aus den letzten beiden Reaktionen wurde geschlossen, daß die Abspaltung von CoA einen relativ späten Schritt darstellt, dem zumindest die Decarboxylierung vorausgeht. Der in Abb. 4 dargestellte Reaktionsmechanismus wurde daraufhin vorgeschlagen (KREUZALER et al. 1978).

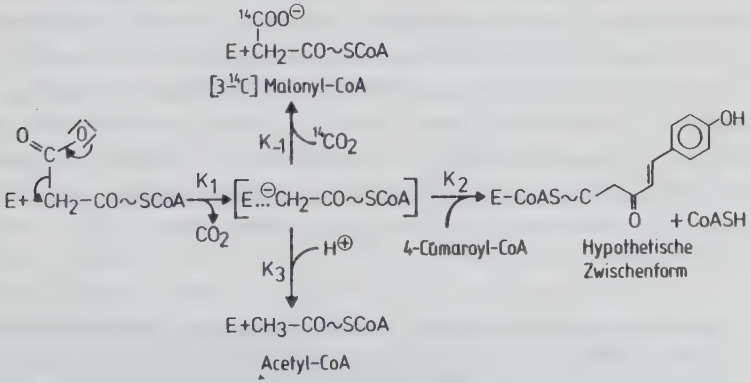


Abb. 4 Hypothetischer Mechanismus für die Chalconsynthase-Reaktion (nach KREUZALER et al. 1978)

Die CHS aus Petersilie hat die Eigenschaft in vitro nicht nur Naringenin zu bilden sondern auch sogenannte "Nebenprodukte", die als Artefakte interpretiert werden und in vivo nicht vorkommen sollen. Die Nebenprodukte wurden identifiziert als Styrylpyron-, Benzalaceton- und Dihydropyron-Derivate von 4-Cumaroyl-CoA und sind Derivate von vorzeitig freigesetzten Vorstufen des Naringenins (HRAZDINA et al. 1976).
Die CHS-Reaktion besitzt einige Analogien zur Fettsäurebiosynthese. Die oben erwähnten Reaktionen Malonyl-CoA-Decarboxylierung und CO_2-Austausch werden auch von Fettsäuresynthetasen (FS) katalysiert (ALBERTS et al. 1972, KRESZE et al. 1977). Die sukzessive Anlagerung von Acetat-Einheiten gleicht der Kettenverlängerung bei der Biosynthese der Fettsäuren. Beide Enzyme (FS und CHS) werden gehemmt durch SH-Gruppen oxidierende Reagenzien und durch Cerulenin, einem spezifisch wirkenden Antibiotikum. Die CHS enthält allerdings weder einen 4'-Phosphopantethenyl-Rest noch Fragmente davon, wie Pantothensäure, β-Alanin, Cysteamin (siehe Abb. 51) und unterscheidet sich damit von dem FS-Typ I [1] (KREUZALER und HAHLBROCK 1975b). Von Größe und Zusammensetzung her hat die CHS Ähnlichkeit mit der β-Ketoacyl-acylcarrierprotein-Synthase, einer Untereinheit der FS-Typ II. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß die CHS auch aliphatische CoA-Thioester als Startersubstrate akzeptiert und die entsprechenden Phloroglucinol-Derivate bildet, mit ähnlichen Raten wie die Naringenin-Bildung mit 4-Cumaroyl-CoA als Substrat (SCHÜTZ et al. 1983). Es wurde diskutiert, daß die CHS ein homologes Protein zu der β-Ketoacyl-ACP-Synthase aus Plastiden darstellt.

1) Die verschiedenen FS wurden in zwei Gruppen eingeteilt (BLOCH und VANCE 1977). Typ I: Einzelnes Protein oder Polymer aus identischen Untereinheiten, multifunktionell (FS von Säugetieren, Hefe, vielen Bakterien). Typ II: Multienzymkomplex, verschiedene Proteine tragen verschiedene Funktionen (FS von *E. coli*, Pflanzen (Plastiden))

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß auch die FS aromatische CoA-Substrate als Primer (anstatt Acetyl-CoA) akzeptierte (SMITH und STERN 1983).
Aus zahlreichen Pflanzenarten wurde CHS isoliert und mehr oder weniger charakterisiert. Vor allem hinsichtlich der Substratspezifität zeigten sich erhebliche Unterschiede. Die CHS aus Tulpen-Antheren besitzt eine geringe Substratspezifität. Sie bildet mit 4-Cumaroyl-CoA, Caffeoyl-CoA und Feruloyl-CoA die entsprechenden Flavanone (Chalcone) (SÜTFELD et al. 1978). Ähnlich verhält sich die CHS aus *Cosmos* (SÜTFELD und WIERMANN 1981). Die Enzyme aus *Petroselinum hortense*, *Haplopappus gracilis* (SALEH et al. 1978), *Dianthus caryophyllus* (SPRIBILLE und FORKMANN 1982a) und *Daucus carota* (HINDERER 1982) katalysieren in vitro sowohl die Bildung von Naringenin als auch die von Eriodictyol, allerdings mit verschiedenen pH-Optima. Eine hohe Spezifität für 4-Cumaroyl-CoA besitzen die Synthasen aus *Matthiola incana* (SPRIBILLE und FORKMANN 1981), *Antirrhinum majus* (SPRIBILLE und FORKMANN 1982b) und *Phaseolus vulgaris* (WHITEHEAD und DIXON 1983), die mit Caffeoyl-CoA kein Eriodictyol bilden.
Die CHS gehört zur Gruppe II und wird in Petersilie-Suspensionskulturen durch Licht aber nicht durch Verdünnung und Elicitorenbehandlung induziert (HAHLBROCK 1977, HELLER et al. 1979, HAHLBROCK et al. 1981). In Kulturen von *Phaseolus vulgaris* kann die CHS dagegen durch Elicitoren induziert werden (LAWTON et al. 1983a). In beiden Systemen wird auch die PAL induziert. Eine posttranslationale Regulation der CHS scheint auf Grund bisheriger Erkenntnisse unwahrscheinlich, obwohl auch inaktive CHS nachgewiesen wurde (SCHRÖDER und SCHÄFER 1980). Durch die kurze Halbwertszeit (6 h) der CHS (SCHRÖDER und SCHÄFER 1980) könnte eine effektive Regulierung der CHS-Aktivität über die Steuerung der Syntheserate erfolgen.

6. Problemstellung

Vor Beginn dieser Arbeit hatte sich schon angedeutet, daß die CHS die limitierende Enzymaktivität für die Anthocyansynthese in *Daucus carota* Kalluskulturen sein könnte. In DC_w-Kulturen war die CHS-Aktivität nicht nachweisbar (HINDERER 1982). Da unsere Kulturen allerdings seit über 12 Jahren als getrennte Zellinien kultiviert wurden, waren genetische Veränderungen nicht auszuschließen. Mit Hilfe von Suspensionskulturen, die höhere spezifische Aktivitäten der Enzyme des Anthocyanstoffwechsels besitzen, sollte die Wirkung von GA_3 systematisch untersucht werden. Die Arbeitshypothese, nach der GA_3 kurzfristig einen physiologischen Block auf der Stufe der CHS erzeugt, sollte u.a. durch Supplementationsexperimente mit Anthocyanvorstufen hinter der Blockierungsstelle überprüft werden.
Weiter war geplant, die analoge Differenzierung in violette Zentralblüten und weiße Randblüten im Blütenstand der Wilden Möhre, auf der Basis extrahierbarer Enzymaktivitäten zu untersuchen.
Die noch offene Frage, ob bei *Daucus carota* die 3'-Hydroxylierung am B-Ring von Cyanidin auf der Stufe der Zimtsäuren ("Zimtsäure-Start-Hypothese", HESS 1968) oder auf der Stufe der Flavonoide ("Substitutionshypothese", GRISEBACH und PATSCHKE 1961) erfolgt, sollte u.a. mittels Charakterisierung der Substratspezifität der CHS beantwortet werden.
Durch Hemmung der Anthocyansynthese mit L-AOPP, einem sehr spezifischen Inhibitor der PAL (NOÉ et al. 1980, NOÉ und SEITZ 1982, 1983a und b) sollte geklärt werden, ob eine gemeinsame Regulation von PAL und CHS erfolgt und ob fehlendes Substratangebot die CHS-Aktivität beeinflußt. Ein Vergleich der "physiologischen" Hemmung durch GA_3 mit der "artifiziellen" durch L-AOPP, im Hinblick auf Enzymaktivitäten und freie Aminosäuren könnte zusätzliche Informationen über die Regulation der beiden Schlüsselenzyme

PAL und CHS liefern.
In Mischexperimenten mit Extrakten aus Kallus (DC_b/DC_w) wurde in vorangegangenen Arbeiten (HINDERER 1982) ein Protein nachgewiesen, welches im CHS-Test Hemmaktivität besaß. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag darin, diese Hemmung aufzuklären. Dazu sollten CHS und "Inhibitor" gereinigt werden um molekulare Grundlagen der Hemmung aufklären zu können. Ferner sollte überprüft werden, ob es sich um eine posttranslationale Regulation der CHS unter Einwirkung von GA_3 handelt.
In unserer Arbeitsgruppe wird zur Zeit der Transport mit isolierten Vakuolen studiert. In Zusammenarbeit mit Wolfgang Hopp ergab sich die Gelegenheit, das nicht uninteressante "Nebenproblem" der Lokalisation der Enzyme des Anthocyanstoffwechsels anzugehen, d.h. eventuelle Enzymaktivitäten in oder an Vakuolen nachzuweisen.

II MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchsobjekte

1.1. Wilde Möhre

Blüten der Wilden Möhre (*Daucus carota* L.) wurden in den Zeiträumen Juli 1982 und Juli 1983 in der näheren Umgebung von Tübingen gesammelt. Es wurden nur solche Pflanzen berücksichtigt, die eine (oder mehrere) gefärbte Zentralblüte(n) innerhalb der Dolde besaßen. Weiße Randblüten und violette Zentralblüten wurden unmittelbar nach dem Abzupfen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -70 °C aufbewahrt.

1.2. Gewebekulturen

1.2.1. Kalluskulturen

Die Kalluskulturen hatten die Funktion einer Erhaltungskultur und dienten nicht direkt als Versuchsmaterial. Die Kultur wurde 1966 aus der anthocyanhaltigen Wurzel einer afghanischen Kulturform der Karotte ("black carrot", *Daucus carota* ssp. *sativum*) angelegt (ALFERMANN und REINHARD 1971). Die Kultivierung erfolgte auf vollsynthetischem I2a-Agar-Medium (SEITZ und RICHTER 1970) bei 26 °C und Dunkelheit. Es existieren zwei Zellinien, die mit DC_b und DC_w bezeichnet wurden. Die eigentliche Stammform (DC_b) akkumuliert große Mengen an Anthocyan. Durch Gabe von Gibberellinsäure (GA_3) in das Kulturmedium (0,3 µM), erhielt man eine völlig anthocyanfreie Kultur (DC_w), die seit über 10 Jahren permanent auf GA_3-haltigem Nährboden kultiviert wurde (SCHMITZ und SEITZ 1972). Beide Zellinien wurden in dreiwöchigen Abständen überimpft, die DC_b-Kultur selektiv, d.h. es wurden die am stärksten pigmentierten

Bereiche übertragen.

1.2.2. Suspensionskulturen

In regelmäßigen Zeitabständen wurden aus den Kalluskulturen Suspensionskulturen angelegt. Dazu wurden ca. 5-10 g Kalluszellen durch ein Sieb (Teesieb, Edelstahl, Maschenweite 0,5-1,0 mm) gerieben und in 100 ml I2a-Medium (ohne Agar) auf einem Rundschüttler (Pilot Shake, Braun, Melsungen) bei 110 Upm und 26 °C kultiviert. Die Zellsuspension wurde nach 5 d durch ein Sieb (siehe oben) filtriert und das Filtrat 1 : 1 mit frischem Nährmedium verdünnt (1. Passage).
Von dieser Kulturperiode an betrug das Kulturvolumen 70 ml und die Passagenlänge 7 d. Da die Zellkultur in den ersten Passagen sehr langsam wächst, wurden die Zellen vor dem Überimpfen sedimentiert (15 min stehen lassen) und 30-50 ml Medium abdekantiert. Von dieser konzentrierten Zellsuspension wurden 20 ml (2. und 3. Passage), später 10 ml (3. und 4. Passage) angeimpft. Die kritische Zellmenge beim Animpfen beträgt etwa 1 g.
Ab der 5. Kulturperiode konnte auf die Konzentrierung der Zellsuspension durch Abgießen von Medium verzichtet werden. Das normale Überimpfverhältnis betrug dann 10 ml Zellsuspension (7 d alt) zu 60 ml frisches Medium. Die Suspensionskultur wurde in 250 ml Erlenmayer-Kolben, mit Watte-Mull-Stopfen verschlossen, bei 26 °C unter Dauerdunkelheit kultiviert. Die aus DC_b angelegten Anthocyan-produzierenden Zellkulturen wurden zwischen der 6. und 20. Passage für Versuche verwendet. Während der Versuchsphase dieser Arbeit wurden sechs DC_b-Suspensionskulturen angelegt und mit der in unserem Labor üblichen Nomenklatur b_3, b_4,..,b_8 bezeichnet.
Aus DC_w wurde eine anthocyanfreie Zellkultur angelegt, die bis zur 60. Passage für Versuchszwecke benutzt wurde (w_1).

2. Wachstumsmessungen

2.1. Frischgewicht (FG)

Für die Bestimmung des Frischgewichts (FG) wurden 5 ml Zellsuspension über Glasfaserfilter (SM 13400, Sartorius, Göttingen), unter Verwendung einer Wasserstrahlpumpe, 2 min lang abgesaugt und anschließend gewogen.

2.2. Trockengewicht (TG)

Hierzu wurden die Proben nach der Bestimmung des FG gefriergetrocknet (72 h, Heraeus-Christ, Osterode) und gewogen.
Der Wassergehalt der Zellen konnte dann auf folgende Weise ermittelt werden:

$$\frac{FG - TG}{FG} : 100\ \% = \text{Wassergehalt in \%}$$

3. Bestimmung des Anthocyangehalts

Die gefriergetrockneten Zellen wurden nach der Bestimmung des TG in ein Zentrifugenglas überführt, mit 5 ml Methanol : HCl (konz.) = 99 : 1 (v/v) versetzt und mit einem Gummistopfen verschlossen. Die Extraktion der Anthocyane erfolgte mit Hilfe eines Labor-Mixers (1 min, höchste Stufe). Nach einer Zentrifugation bei 4000 g für 15 min (Minifuge, Heraeus-Christ, Osterode) wurde die Extinktion bei 537 nm mit einem Photometer bestimmt (Typ 250, Gilford, Oberlin, USA).
Die Bestimmungen unter 2. und 3. erfolgten mit 2 Parallelproben.

4. Analyse freier Aminosäuren

4.1. Extraktion freier Aminosäuren

Gefriergetrocknete Suspensionszellen (50 mg) wurden mit

5 ml Methanol (70 %, v/v) in einem Homogenisiergefäß (5 ml) nach Potter-Elvehjem, Glas auf Glas (Braun, Melsungen) aufgeschlossen. Nach Inkubation im Wasserbad bei 75 °C für 30 min erfolgte eine Zentrifugation bei 4 000 g, 15 min (Minifuge, Heraeus-Christ, Osterode). Der Überstand wurde abdekantiert und aufbewahrt, das Sediment mit 5 ml Methanol (50 %, v/v) 1 min lang mit Hilfe eines Labor-Mixers (höchste Stufe) aufgewirbelt. Nach Inkubation im Wasserbad wurde erneut zentrifugiert (Bedingungen wie oben), der Überstand wiederum aufbewahrt und das Sediment mit 5 ml Methanol (30 %, v/v) in gleicher Weise behandelt wie oben beschrieben. Alle drei Überstände wurden vereinigt und im Rotationsverdampfer bis zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wurde in 1,5 ml Puffer (siehe 4.2.) aufgenommen, filtriert (0,2 µm Porenweite, N 13307, Sartorius, Göttingen) und bei -70 °C aufbewahrt.
Die Aufarbeitungen erfolgten jeweils mit 2 Parallelproben.

4.2. Trennung und Quantifizierung der freien Aminosäuren

Die Trennung, Identifizierung und quantitative Bestimmung der einzelnen Aminosäuren erfolgte mit einem Aminosäurenanalysator der Fa. Biotronik (Typ LC 6001, Biotronik, Frankfurt). Trennprogramm, Puffer- und Gerätelösungen waren wie in der Bedienungsanleitung angegeben.
Die Trennung beruht auf dem Prinzip der Ionenaustauscherchromatographie. Der Nachweis der Aminosäuren erfolgte, nach Reaktion mit Ninhydrin, photometrisch (570 nm und 440 nm). Durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen der Aminosäuren im Eichstandard, konnten die Aminosäuren identifiziert werden. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines angeschlossenen Integrators und Vergleich der Werte mit denen des Standards.
Die Aminosäurenstandardlösung (Benson Type A-N-B, Biotronik, Frankfurt) enthielt die Aminosäuren in einer Konzentration von je 1 mM. Vor Gebrauch wurde diese Lösung 1 : 5 verdünnt, ferner wurden Asparagin und Glutamin zugesetzt, die auf

Grund mangelnder Stabilität in der Eichlösung nicht enthalten sind. In dem eingespritzten Volumen (50 µl) waren dann von allen Aminosäuren jeweils 10 nMol enthalten.
Die Aminosäuren Prolin und Hdroxyprolin können bei 570 nm nicht detektiert werden. Deswegen erfolgte parallel die Messung bei 440 nm. Es zeigte sich dann im Verlauf der Analysen, daß diese beiden Aminosäuren im Verteilungsmuster keine Rolle spielten. Somit konnten alle Messungen bei 570 nm ausgewertet werden.
Die Proben aus 4.1. wurden vor ihrer Verwendung 1 : 10 verdünnt. Die Analysen erfolgten mit zwei Parallelproben, sodaß für jeden Versuchsansatz (Doppelproben bei der Aufarbeitung) vier Analysen durchgeführt wurden. Für jede Aminosäure wurde der Mittelwert (n=4) und die Standardabweichung berechnet.
Bei einem Teil der Proben wurde nicht Ninhydrin, sondern ein Fluoreszenzreagenz auf der Basis von Phtaldialdehyd verwendet. Der Nachweis der Aminosäuren wurde dadurch etwa um den Faktor 10 empfindlicher, Proben und Standard wurden deshalb nochmals 1 : 10 verdünnt.

5. Herstellung von Enzymrohextrakten für Routinemessungen

Alle Enzymaufarbeitungen wurden bei 0-4 °C durchgeführt.

5.1. Enzymrohextrakte aus Blütenmaterial

5.1.1. Aufarbeitung für Messung von CHS-Aktivität

Die Aufarbeitung erfolgte, bis auf einige Änderungen, wie bei SPRIBILLE und FORKMANN (1981) beschrieben.
0,5 g Blüten wurden zusammen mit 3 g Quarzsand, 8 ml Puffer (KPi 100 mM; pH 8,0; 1,4 mM ME) und 2 g Dowex 1X2 (Phosphatform) in einem Mörser zerrieben. Nach einer Zentrifugation bei 25 000 g für 15 min (Rotor SS 34, Sorvall RC 2-B, Dupont, Newtown, USA) wurde der Überstand durch

Glaswolle abfiltriert, in Portionen von 500 µl eingefroren und bei -70 °C gelagert.

5.1.2. Aufarbeitung für die Messung der PAL-Aktivität

Die Herstellung des Enzymrohextrakts erfolgte in gleicher Weise wie unter 5.1.1. beschrieben, nur wurde Borsäure-Borax-Puffer ($H_3BO_3/Na_2B_4O_7$ 100 mM; pH 8,8) verwendet. Die Zugabe von Dowex erfolgte in der Chloridform.

5.1.3. Aufarbeitung für die Messung der CHI-Aktivität

Hierzu wurde im Anschluß an die Aufarbeitung von 5.1.1. eine Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt. Die Zugabe von festem Ammoniumsulfat erfolgte unter Rühren, innerhalb 15 min, bis zur Endkonzentration von 85 % Sättigung. Nach weiteren 15 min Rühren wurde das präzipitierte Protein bei 38 000 g (15 min) abzentrifugiert (Rotor SS 34, Sorvall RC 2-B, Dupont, Newtown, USA). Das Sediment war sehr fest und konnte vorsichtig gewaschen werden (Puffer siehe 5.1.1.). Resuspendierung erfolgte in 2 ml Puffer mit Hilfe eines Homogenisiergefäßes, Glas auf Glas (2 ml), nach Potter-Elvehjem. Die Proben wurden portioniert (200 µl), eingefroren und bei -20 °C aufbewahrt.

5.2. Enzymrohextrakte aus Suspensionszellen

5.2.1. Aufarbeitung für die Messung von PAL-, CHS-, CHI- und G6PDH-Aktivitäten

Die Messung der Enzyme PAL, CHS, CHI und G6PDH erfolgte aus einem gemeinsamen Extrakt.
Nach Abfiltrieren und Waschen mit Puffer (KPi 20 mM; pH 8,0) wurden 5 g (FG) Suspensionszellen in 10 ml Puffer (siehe 5.1.1.) mit Hilfe eines Schlagmesser-Homogenisators (Ultra-Turrax, Janke und Kunkel, Staufen i. Br.) homogenisiert (3 x 30 sec). Es erfolgte eine Zentrifugation bei 25 000 g für 15 min (Rotor SS 34, Sorvall RC 2-B, Dupont, Newtown, USA).

Der Überstand wurde mit 2,5 g Dowex 1X2 (Phosphatform) für 5 min gerührt. Das Ionenaustauscherharz entfernte quantitativ das Anthocyan und wurde durch Filtration entfernt. Der Rohextrakt, auch als "Dowex-Überstand" bezeichnet, wurde in Portionen von 500 µl eingefroren und bei -20 °C gelagert.

5.2.2. Aufarbeitung für die Messung der 3'-Nucleotidase-Aktivität

Da beim 3'-Nucleotidase-Test freigesetztes Phosphat gemessen wurde, konnte die Aufarbeitung nicht in Phosphat-Puffer erfolgen. Es wurde Tris/HCl (100 mM; pH 7,5) verwendet, außerdem wurde das Dowex in der Chloridform zugesetzt. Ansonsten erfolgte die Aufarbeitung wie unter 5.2.1. beschrieben.

6. Bestimmung der Enzymaktivitäten

6.1. Chalconsynthase

Der CHS-Test wurde, mit einigen Modifikationen, durchgeführt wie bei SCHRÖDER et al. (1979a) beschrieben. Dabei kamen zwei verschiedene Methoden zur Anwendung. Bei der "direkten Methode" wurde der Einbau von Radioaktivität, aus ^{14}C-Malonyl-CoA, in Ethylacetat-lösliches Material bestimmt. Mit der anderen Methode wurde der Anteil an ^{14}C-Naringenin unter den Ethylacetat-löslichen Produkten bestimmt. Chalcone isomerisierten unter den Testbedingungen spontan zu Flavanonen (SÜTFELD und WIERMANN 1980).
Die Cinnamoyl-CoA-Substrate wurden chemisch synthetisiert (siehe 12.1.).
(2-^{14}C)-Malonyl-CoA, mit einer spezifischen Radioaktivität von 2,18 GBq·mmol^{-1}, stammte von Amersham Buchler (Braunschweig) und wurde mit unmarkiertem Malonyl-CoA (Sigma, München) zu einer spezifischen Radioaktivität von 1,14 GBq·mmol^{-1} verdünnt.

6.1.1. Standard Testbedingungen

Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 210 µl:

- 50 µl Enzymrohextrakt
- 150 µl Puffer (KPi 100 mM; 1% (w/v) BSA; 1,4 mM ME; pH 7,9)
- 5 µl 4-Cumaroyl-CoA (1 nMol)
- 5 µl (2-^{14}C)- Malonyl-CoA (1,87 nMol; 139 000 dpm)

Die Bestandteile wurden in der angegebenen Reihenfolge in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Plastibrand, Brand, Wertheim) pipetiert. Die Substrate wurden mit Konstriktionspipetten an den inneren Rand der Gefäße gesetzt. Start der Reaktion erfolgte durch einen kurzen Zentrifugationsschritt, der die Tröpfchen der Substratlösung mit den übrigen Bestandteilen des Testansatzes vereinigte.
Die Inkubation erfolgte bei 30 °C im Wasserbad. Nach 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µg Naringenin, gelöst in 20 µl Methanol, abgestoppt.

6.1.2. Direkte Methode

Durch Extraktion mit Ethylacetat konnten die Reaktionsprodukte von dem ebenfalls radioaktiven Malonyl-CoA abgetrennt werden. Dazu wurde das Reaktionsgemisch unmittelbar nach dem Abstoppen mit 250 µl Ethylacetat versetzt und 1 min lang auf einem Labor-Mixer (höchste Stufe) geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 16 000 g für 10 min (Mikroliter, Hettich, Tuttlingen). Von der organischen Oberphase wurden 200 µl entnommen, der Rest wurde verworfen. Ein Aliquot von 50 µl wurde direkt in 4 ml Unisolve (Zinsser, Frankfurt) auf Radioaktivität getestet.
Die aus der direkten Methode ermittelten Aktivitäten wurden als "Gesamtradioaktivität" oder "Gesamtprodukte" bezeichnet.

6.1.3. Identifizierung und quantitative Bestimmung der Flavanone

Routinemäßig wurde mit einem weiteren Aliquot der Ethylacetatphase (150 µl) eine quantitative Flavanon-Bestimmung durchgeführt. Dazu wurden die Produkte auf Zellulose DC-Platten (0,1 mm; 20 x 20 cm; Merck, Darmstadt) aufgetrennt und mit einem Dünnschicht-Scanner (Berthold, Wildbad) auf Radioaktivität hin vermessen. Im UV-Licht (366 nm) waren die Flavanone, als dunkle Flecken, gut sichtbar. Sie wurden ausgekratzt und in 4 ml Unisolve auf Radioaktivität getestet.

Die aus DC-Platten ausgekratzte Radioaktivität hatte im Vergleich zur direkten Zählung eine durch die Selbstabsorption in Zellulosematerial verminderte Zählausbeute (Abb. 5).

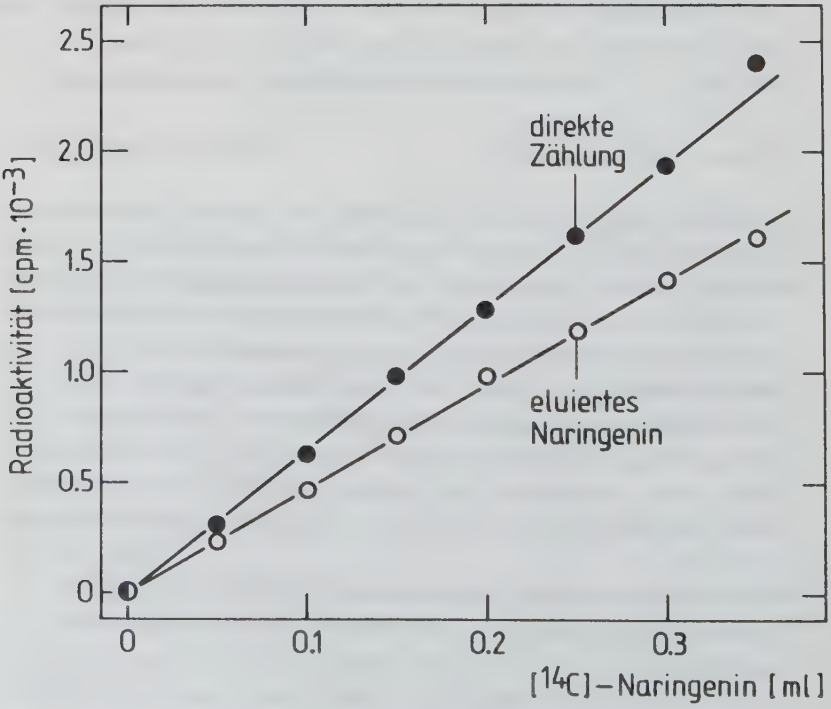


Abb. 5 Verminderte Zählausbeute der Naringeninwerte durch Selbstabsorption in Zellulosematerial, im Vergleich zur direkten Zählung. Korrekturfaktor: 1,37

Tab. 1 Vergleich der R_f-Werte von Flavanonen, isomeren Chalconen und Malonyl-CoA in verschiedenen Laufmitteln (siehe 6.1.3)

	R_f x 100 in Laufmittel				
	I	II	III	IV	V
Naringenin	27	66	72	95	87
Naringeninchalcon	0	15	25	88	57
Eriodictyol	24	59	48	90	79
Eriodictyolchalcon	0	14	12	76	30
Malonyl-CoA	88	98	2	21	44

Als Korrekturfaktor wurde 1,37 ermittelt. Spezifische CHS-Aktivitäten wurden nur mit diesen korrigierten Flavanon-Werten berechnet.

Die Identifizierung der Flavanone erfolgte durch Co-Chromatographie in verschiedenen Laufmitteln. Dabei wurden folgende Systeme verwendet:

I : 15 % (w/v) Ethanol

II : 30 % (w/v) Essigsäure

III: Chloroform : Essigsäure : H_2O = 10 : 9 : 1 (v/v/v)

IV : n-Butanol : Essigsäure : H_2O = 5 : 2 : 3 (v/v/v)

V : Isobuttersäure : H_2O : NH_3: EDTA (100 mM) = 500 : 280 : 21 : 8 (v/v/v/v)

Tabelle 1 zeigt die R_f-Werte die für die Flavanone, isomeren Chalcone und Malonyl-CoA bestimmt wurden. Die Standard-Laufmittel waren I und III.

Die Flavanone und Chalcone sind im UV-Licht (366 nm) als dunkle Flecken (Löschung) gut zu erkennen. Die Chalcone sind außerdem bei sichtbarem Licht intensiv gelb gefärbt.

^{14}C-Malonyl-CoA wurde auf Grund seiner Radioaktivität lokalisiert. Unmarkiertes Malonyl-CoA wurde co-chromatographiert und kann als dunkler Fleck bei 254 nm (Löschung) gesehen werden.

6.1.4. Abweichungen vom Standard-Test

CHS-Testansatz für Blütenextrakte:
Geändert wurde: a) der pH-Wert des Puffers: 7,5 statt 7,9
b) die Reaktionszeit: 60 min statt 30 min.

CHS-Testansatz mit partiell gereinigter CHS:
Es wurde weniger Enzymextrakt eingesetzt (20 µl), dafür wurde entsprechend mehr Puffer verwandt.

CHS-Testansatz mit Fraktionen aus der Ionenaustauscher-chromatographie:
Da die Eluate z.T. sehr verdünnt waren, wurden 100 µl im Test eingesetzt und entsprechend weniger Puffer verwandt. Die Reaktionszeit betrug 60 min. Die CHS-Aktivität wurde nur nach der direkten Methode bestimmt und zwar durch Zählung der gesamten Ethylacetatphase (200 µl).

Caffeoyl-CoA als Substrat:
Ein Teil der Tests wurde mit Caffeoyl-CoA an Stelle von 4-Cumaroyl-CoA als Substrat durchgeführt. Der Testpuffer besaß dann einen pH-Wert von 6,8 (Suspensionszellen) oder 6,3 (Blüten). Außerdem enthielt die Stopplösung Eriodictyol anstatt Naringenin.

Mischexperimente:
Um Extrakte auf Hemmaktivität zu testen, wurden Misch-experimente durchgeführt. Der Testpuffer enthielt in diesem Falle kein BSA und die Reaktionszeit betrug 60 min. Es wurden stets 20 µl partiell gereinigte CHS eingesetzt. Das eingesetzte Volumen der auf Hemmung zu testenden Extrakte variierte von Fall zu Fall. Bei Fraktionen aus der Ionen-austauscherchromatographie betrug es konstant 50 µl. Als Kontrolle bei Mischexperimenten diente ein Ansatz mit hitzedenaturiertem Extrakt (30 min, 100 °C).

6.2. Chalconisomerase (EC. 5.5.1.6)

Die Bestimmung der CHI-Aktivitäten erfolgte, mit kleinen Änderungen, wie bei FORKMANN und KUHN (1979) beschrieben.
Testansatz: V=1 ml, T=30 °C

- 970 µl Puffer (KPi 100 mM; pH 8,0; 1,4 mM ME)
- 20 µl Enzymextrakt
- 10 µl Substratlösung (2 $mg \cdot ml^{-1}$ Naringenin-chalcon in EGME)

Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe des Substrats. Die Abnahme der Chalcon-Konzentration wurde als Extinktionsabnahme bei 385 nm im Spectralphotometer gemessen (Typ 250, Gilford, Oberlin, USA). Die Reaktion ist nur für etwa 30-60 sec linear. Die ΔE/t-Werte wurden innerhalb der ersten 15 sec bestimmt und korrigiert um die Werte der nicht-enzymatischen (spontanen) Isomerisierung zum Flavanon, bestimmt in Kontrollansätzen ohne Enzymextrakt.
Die CHI-Tests erfolgten mit 3 Parallelproben.

6.3. Phenylalanin Ammonium-Lyase (EC. 4.3.1.5.)

Der PAL-Test geht zurück auf KOUKOL und CONN (1961) und ZUCKER (1965). Die Bildung der t-Zimtsäure wurde photometrisch bei 290 nm verfolgt. Der Test wurde durchgeführt wie bei HEINZMANN und SEITZ (1974) beschrieben.

6.4. Glucose 6-phosphat-Dehydrogenase (EC. 1.1.1.49)

Die Aktivität der G6PDH (D-Glucose 6-phosphat : NADP-Oxidoreduktase) wurde mit einem optischen Test bestimmt. Dabei wurde die Zunahme von NADPH bei 340 nm gemessen (BERGMEYER 1970).

6.5. 3'-Nucleotidase (EC. 3.1.3.6.)

Die Aktivitätsbestimmung der 3'-Nucleotidase (3'- Ribonucleotid-Phosphohydrolase) erfolgte durch Messung von

freigesetztem anorganischem Phosphat aus 3'-Nucleotiden nach der Methode von LIN und MORALES (1977).

Testansatz: V=200 µl, T=30 °C

- 160 µl Puffer (Bis-Tris/HCl 20 mM; pH 7,0)
- 20 µl 3'-Adenylat (Adenosin 3'- monophosphat, 3'-AMP; 10 mM in Bis-Tris/HCl 20 mM; pH 6,5)
- 20 µl Enzymextrakt

Nach 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl Phosphatreagenz (LIN und MORALES 1977) abgestoppt und die Extinktion nach exakt 3 min bei 366 nm gemessen. Als Kontrollwert diente dabei ein Ansatz der zum Zeitpunkt t=0 abgestoppt wurde. Aus den ΔE_{366}-Werten ($E_{t=30} - E_{t=0}$) konnte mit Hilfe einer Eichkurve die freigesetzte Phosphatmenge bestimmt werden. Die Eichkurve wurde mit verschiedenen Konzentrationen an KPi in Puffer ermittelt. Bei jeder Testserie wurde eine neue Eichkurve erstellt.
Ein Teil der Tests wurde mit CoA-SH als Substrat durchgeführt. Bei schwachen Aktivitäten wurde die Testzeit auf 60 min verlängert und die Temperatur auf 37 ° erhöht. Bei hohen Aktivitäten wurde die Testzeit verkürzt auf 10 min oder der Enzymextrakt wurde verdünnt.

7. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteingehalte der Zellen und der Enzymextrakte erfolgte nach BRADFORD (1976). Als Eichstandard wurde BSA verwendet.

8. Reinigung der Chalconsynthase

8.1. Dowex-Überstand

10 Tage alte Suspensionszellen wurden abfiltriert und mit Puffer (KPi 20 mM, pH 8,0) gewaschen (25 ml pro Inhalt eines Kulturgefäßes). Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

200 g dieser gefrorenen Zellen wurden im Mörser unter Verwendung von flüssigem Stickstoff zerrieben. Unter Rühren wurde das Zellpulver in 400 ml Puffer (KPi 100 mM; pH 8,0; 1,4 mM ME) aufgetaut und anschließend mit einem Ultra-Turrax (Janke und Kunkel, Staufen i. Br.) homogenisiert. Nach einer Zentrifugation bei 16 000 g für 15 min (Rotor GSA, Sorvall RC 2-B, Dupont, Newtown, USA) wurde der Überstand mit 100 g Dowex 1X2 (Phosphatform) für 5 min gerührt. Entfernung des Ionenaustauscherharzes erfolgte durch Filtration.

8.2. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Direkt im Anschluß daran wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung zwischen 50 und 80 % Sättigung durchgeführt. Dabei wurde eine 100 % gesättigte Ammoniumsulfatlösung verwendet, die mit konz. NH_3 auf pH 7,5 eingestellt wurde. Der Extrakt aus 8.1. wurde innerhalb 15 min auf 50% Sättigung gebracht und für weitere 15 min gerührt. Das präzipitierte Protein wurde abzentrifugiert (27 000 g, 30 min) und verworfen. Der Überstand wurde dann auf 80% Sättigung gebracht, innerhalb 15 min, für weitere 15 min gerührt und wieder zentrifugiert (27 000 g, 30 min). Die Resuspendierung des Sediments erfolgte in 15 ml Puffer (KPi 100 mM; pH 7,0) mit Hilfe eines Homogenisiergefäßes (15 ml) nach Potter-Elvehjem (Glas auf Glas).

8.3. Entsalzung mit Sephadex G-25

Die Proteinlösung wurde filtriert (0,2 µm Porenweite, SM 16534 K, Sartorius, Göttingen) und auf eine Sephadex G-25 (fine)-Säule (2,6 x 16 cm) gebracht. Das Gel war mit Bis-Tris/HCl-Puffer (20 mM; pH 6,5) equilibriert. Mit demselben Puffer wurde das Protein eluiert. Neben einer Entsalzung fand mit diesem Schritt zugleich eine Umpufferung statt. Am Auslauf wurde die Transmission bei 280 nm gemessen (Uvicord II, LKB, Stockholm, Schweden). Das gesammte Protein im Ausschlußvolumen (30 ml) wurde gesammelt.

8.4. Chromatographie an Ionenaustauschern

8.4.1. Vorversuche

Um die geeigneten Trennbedingungen zu ermitteln, wurde in Vorversuchen der Isoelektrische Punkt der CHS näherungsweise bestimmt. Benutzt wurde DEAE-Sephacel und 10 mM Puffer mit verschiedenen pH-Werten (KPi, pH 5-7,5; MES-Acetat, pH5-6). Auch die Ionenstärke (mit NaCl) bei der sich die CHS von DEAE-Sephacel ablöst, wurde durch einen Vorversuch ermittelt. Dabei wurden Bis-Tris/HCl-Puffer (20 mM; pH 6,5) und Tris/HCl-Puffer (20 mM; pH 7,5) verwendet. Beide Vorversuche wurden durchgeführt, wie in der Produktbeschreibung von Pharmacia ("Handbook of Ionexchange Chromatography", Pharmacia, Uppsala, Schweden) angegeben.

8.4.2. DEAE-Sephacel

Die entsalzte Proteinfraktion aus 8.3. (30 ml) wurde sofort auf eine DEAE-Sephacel-Säule (2,6 x 21 cm) gebracht. Die Säule war mit Elutionspuffer (Bis-Tris/HCl 20 mM; pH 6,5) equilibriert. Das Protein wurde mit einer Flußrate von 50 $ml \cdot h^{-1}$ eluiert. Nach 100 ml startete ein linearer NaCl-Gradient (0-300 mM, $\Delta C/t$ = 15 $mM \cdot h^{-1}$) gesteuert durch einen programmierbaren Gradientenmixer (Ultrograd, LKB, Stockholm, Schweden). Die Transmission bei 280 nm wurde kontinuierlich aufgezeichnet (Uvicord II, LKB, Stockholm, Schweden). Die NaCl-Konzentration wurde nachträglich mit einem Abbé-Refraktometer (Zeiss, Oberkochen) bestimmt. CHS-aktive Fraktionen (à 4 ml) wurden vereinigt (ca 100 ml) und eingeengt durch Ultrafiltration (PM 10 000, Amicon, Osterhout, Holland) auf 3-4 ml bzw. 4 mg Protein pro ml. Die Präparation wurde in Portionen (200 µl) eingefroren und bei -70 °C gelagert.

8.4.3. Mono Q

Im Rahmen einer Gerätevorführung der Fa. Pharmacia (1 wurden Trennungen auf der Mono Q-Säule (HR 5/5, 0,5 x 0,5 cm) des FPLC-Systems (Pharmacia, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Das Mono Q-Material ist ein starker Anionenaustauscher. Die Vorteile des Systems liegen darin, daß mit Drucken bis 100 bar gearbeitet werden kann. Man erzielt damit hohe Flußraten und die Trennzeiten liegen in der Regel unter 30 min.
Die entsalzte Probe aus 8.3. (30 ml) wurde in diesem Falle durch Ultrafiltration auf 10 ml konzentriert (siehe 8.4.2.) eingefroren und gelagert bei -20 °C.
Nach dem Auftauen wurde die Probe erneut filtriert (0,2 µm Porenweite, SM 16534 K, Sartorius, Göttingen) und auf die Säule gebracht. Als Puffer wurde Bis-Tris/HCl (20 mM; pH 6,5) verwendet. Die Elution erfolgte mit einem nichtlinearen Gradienten von 0-700 mM NaCl. Die Säule wurde mit 5-10 mg Protein beladen, die Flußraten betrugen 1-2 $ml \cdot min^{-1}$. Die Trennungen erfolgten bei Raumtemperatur mit auf Eis gekühlten Pufferlösungen.
CHS-aktive Fraktionen (à 1,5 ml) wurden vereinigt, konzentriert durch Ultrafiltration (siehe oben), in 200 µl-Portionen eingefroren und bei -70 °C gelagert.

8.5. Nachweis von CHS-Protein und Bestimmung des Molekulargewichts der CHS-Untereinheit (2

Zum Nachweis von CHS-Protein wurden Rohextrakte aus 5.1.1. und 5.2.1. und partiell gereinigte CHS aus 8.4.2. verwendet. Die angewandten Methoden sind ausführlich beschrieben bei

1) Bei Herrn Thomas Blaicher (Pharmacia, Freiburg) bedanke ich mich an dieser Stelle für wertvolle Hinweise und sein Interesse für das Trennproblem
2) Mein besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang Frau Dr. Susanne Köster (geb. Rall) für die intensive Unterstützung bei der Anwendung dieser Methode

RALL (1983).
Die einzelnen Schritte waren:

- SDS-Disk-Elektrophorese
- Protein-Blotting
- Immunpräzipitation und PAP-Färbung.

Sämtliches für die Durchführung notwendige Material wurde von Frau Dr. S. Köster (Münster) zur Verfügung gestellt.
Zu Beginn wurde mit den Extrakten eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt (Trenngel 10 %, Sammelgel 3 % Polyacrylamid). Zur nachträglichen Bestimmung des MG der CHS-Untereinheit wurde ein Gemisch von Eichproteinen (LMW, Pharmacia, Uppsala, Schweden) mitaufgetragen, die später durch Färbung nachgewiesen wurden.
Nach der Elektrophorese wurden die Proteine aus dem Gel elektrophoretisch auf Nitrocellulose transferiert (Blotting). Die Immunpräzipitation der CHS erfolgte auf dem Nitrocellulose-Filter. Es wurde Kaninchen-Antiserum gegen Petersilie-CHS verwendet, welches von Herrn Prof. Dr. K. Hahlbrock (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln) zur Verfügung gestellt wurde.
Der Nachweis der CHS erfolgte dann mit der PAP-Methode (Peroxidase Anti-Peroxidase). Dabei wurde eine Peroxidase-Aktivität über drei verschiedene Antikörper an die CHS gekoppelt:

1. Antikörper aus Kaninchen gegen CHS aus Petersilie
2. Antikörper aus Ziege gegen IgG aus Kaninchen
3. Antikörper aus Kaninchen gegen Peroxidase aus Meerrettich, bereits gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase (PAP)

Die Peroxidase wurde mit einer Farbreaktion nachgewiesen.

9. Reinigung der 3'-Nucleotidase

9.1. Reinigung auf Hemmwirkung im CHS-Test

Die Hemmung der CHS mit Extrakten aus anthocyanfreien Karottenzellen konnte erst im späteren Teil dieser Arbeit auf eine 3'-Nucleotidase-Aktivität zurückgeführt werden.

Deswegen wurde im überwiegenden Teil der Aufarbeitungen auf Anreicherung der Hemmaktivität hin gereinigt. Die einzelnen Schritte erfolgten in gleicher Weise, wie für die CHS beschrieben (8.1. - 8.4.).
Bei der Ammoniumsulfatfällung wurde in einem Fall bis 85 % Sättigung (für Mono Q) ansonsten zwischen 60 % und 80 % Sättigung (für DEAE-Sephacel) präzipitiert.
Bei der Trennung auf der Mono Q-Säule wurden Tris/HCl-Puffer (20 mM; pH 7,5) verwendet.

9.2. Reinigung auf Phosphatase-Aktivität

Zur Anwendung kam dabei der unter 6.5. beschriebene Test. Die Aufarbeitung erfolgte wie für die CHS (8.1. - 8.3.), nur wurde Phosphatpuffer durch Tris/HCl (100 mM; pH 7,5) ersetzt. Auf ME wurde verzichtet. Nach einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung (60 % - 80 % Sättigung) erfolgte eine Trennung auf der Mono Q-Säule, dabei wurde Bis-Tris/HCl-Puffer (20 mM; pH 6,5) verwendet. Die Fraktionen wurden mit drei verschiedenen Substraten auf Phosphatase-Aktivität hin getestet (Adenosin 3'-monophosphat, Adenosin 5'-monophosphat, Glucose 6-phosphat) um die 3'-Nucleotidase von übrigen Monophosphatasen unterscheiden zu können.

10. In vivo-Versuche mit Suspensionskulturen

10.1. Versuche mit Gibberellinsäure

Die Gibberellinsäure (GA_3) wurde von Merck (Darmstadt) bezogen (Auxillin ®). Der Hersteller gibt für das Präparat einen GA_3 Gehalt von 90 % an. Bei den restlichen 10 % handelt es sich um nicht näher definierte, inaktive Gibberellin-Isomere.
Es wurde eine 3 mM Stammlösung verwendet, die auf folgende Weise hergestellt wurde:
104 mg Auxillin wurden in 100 ml bidestilliertem Wasser bei

Raumtemperatur gelöst (1-2 h). Die Lösung ist bei dieser Temperatur nahezu gesättigt. Die Stammlösung wurde in 10 ml Portionen eingefroren und bei -20 °C gelagert. Erst unmittelbar vor Gebrauch wurde die GA_3-Lösung aufgetaut und sterilfiltriert zugegeben (0,2 µm Porenweite, SM 16534 K, Sartorius, Göttingen).
Die aus DC_w-Kallus angelegte anthocyanfreie Suspensionskultur (w_1) wurde in GA_3-haltigem (30 µM) I2a-Medium kultiviert. Die anthocyanproduzierenden Zellkulturen erhielten einmalige Dosen an GA_3, entweder beim Animpfen oder 7 d später, in verschiedenen Konzentrationen. Die Kontrollen erhielten jeweils H_2O. Wachstum, Anthocyangehalt und Enzymaktivitäten wurden in verschiedenen Zeitabständen gemessen bis längstens 12 d nach dem Animpfen.

10.2. Supplementationsversuche

Die Kulturen erhielten 30 µM GA_3 am Überimpftag. Die Zugabe der einzelnen Falvonoide (Naringenin, Eriodictyol, Dihydroquercetin und Quercetin) erfolgte 8 d später. Die Substanzen wurden in DMSO vorgelöst (50 mM), 1 : 1 mit H_2O verdünnt und in einer Endkonzentration von 100 µM den Kulturen sterilfiltriert zugegeben (0,28 ml auf 70 ml Zellsuspension). Die Endkonzentration an DMSO betrug dann 0,2 % (v/v). Den Kontrollen wurde DMSO (0,2 %) oder H_2O gegeben. Die Ermittlung der Anthocyangehalte und Enzymaktivitäten erfolgte 48 h nach Gabe der Flavonoide. Für die Erstellung der Einbaukinetik wurde eine Kultur verwendet, die seit 7 Passagen in GA_3-haltigem Medium kultiviert wurde.

10.3. Versuche mit L-AOPP

L-α-Aminooxy-β-phenylpropionsäure (L-AOPP) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. N. Amrhein (Bochum) zur Verfügung gestellt. L-AOPP wurde in Wasser gelöst (10 mM) und den Kulturen in einer Endkonzentration von 100 µM steril

zugegeben. Ein Kontrollansatz erhielt nur Wasser. Die Zugabe erfolgte am Überimpftag. Wachstum, Anthocyangehalt und Enzymaktivitäten wurden bis 12 d nach dem Animpfen verfolgt.

10.4. Versuche mit Lanthanchlorid

$LaCl_3$ wurde als 100fach konzentrierte wässrige Stammlösung unter sterilen Bedingungen zugegeben.
Die Endkonzentrationen waren: 1 µM, 10 µM und 100 µM. Die Kontrollen erhielten Wasser. Es wurde Langzeitwirkung (10 d) und Kurzzeitwirkung (12 h) auf Wachstum, Anthocyangehalt und Enzymaktivitäten untersucht.

10.5. Versuche mit Ca^{2+}-Ionophor A 23 187

Der Ca^{2+}-Ionophor A 23 187 (Sigma, München) wurde in ethanolischen Stammlösungen (1 mM) bei -20 °C aufbewahrt. Vor Zugabe wurde mit Wasser eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Ionophorlösung wurde sterilfiltriert zugegeben, die Endkonzentrationen betrugen 0,1 - 10 nM. Die Zugabe erfolgte zu 9 d alten Zellen, 24 h später wurden PAL und CHS-Aktivität bestimmt.

10.6. Phosphat- und Nitratmangel

Gegenstand der Untersuchungen war der Einfluß von reduziertem Phosphat bzw. Nitrat im Medium auf Wachstum und Anthocyangehalt.
Das I2a-Medium enthält Salze nach MURASHIGE und SKOOG (1962) mit 39,4 mM Nitrat und 1,24 mM Phosphat. Im phosphat- bzw. nitratarmen Medium waren nur ein Drittel des jeweiligen Anions im Vergleich zum I2a-Medium enthalten. Ein osmotischer Ausgleich (zugleich Kalium-Ausgleich) erfolgt duch KCl.
Die Zusammensetzung der Nährsalze in den verwendeten Nährmedien zeigt Tabelle 2.
Die Kulturen wurden in die jeweiligen Medien überimpft,

Tab. 2 Salzkonzentrationen der verwendeten Nährmedien im Phosphat- und Nitratmangel-Versuch

Medium	Salze (mM), außer $CaCl_2$ (3 mM) und $MgSO_4$ (1,5 mM)			
	KH_2PO_4	KNO_3	NH_4NO_3	KCl
I2a	1,25	18,80	20,60	-
Phosphatarm (-2/3)	0,42	18,80	20,60	0,83
Phosphatfrei	-	18,80	20,60	1,25
Nitratarm (-2/3)	1,25	6,27	6,87	26,26
Nitratfrei	1,25	-	-	39,40

Wachstum und Anthocyangehalt 12 d lang verfolgt.

11. Versuche zum Nachweis der Enzyme des Anthocyanstoffwechsels in gereinigten Vakuolenpräparationen

Die Isolation und Reinigung von Anthocyan-haltigen Vakuolen erfolgte aus lysierten Protoplasten einer 8 d alten Suspensionskultur. Die Methode ist beschrieben bei HOPP et al. (1983).

Die Vakuolensuspension (8 ml) wurde in folgender Weise aufgearbeitet (alle Schritte bei 0 - 4 °C):

Es erfolgte eine Umpufferung auf KPi (100 mM; pH 8,0) durch Ultrafiltration (siehe 8.4.2.). Der Vakuolenextrakt wurde mit einem Homogenisator (Glas/Glas) nach Potter und Elvehjem homogenisiert und mit 1 g Dowex (Phosphatform) behandelt (siehe 5.2.1.). Dann erfolgte eine Zentrifugation bei 100 000 g für 60 min (Rotor SW 27, Beckmann Ultrazentrifuge). Das Sediment wurde in 2 ml Puffer resuspendiert und eingefroren. Das Protein des Überstandes wurde mit Ammoniumsulfat präzipitiert (0 - 85 % Sättigung) und über Sephadex G-25 entsalzt (siehe 8.2. und 8.3.). Nach einer erneuten Ultrafiltration (Konzentrierung auf ca. 1,5 ml), wurden die Proben eingefroren und bei -20 °C

gelagert.
In gleicher Weise wurde ein Parallelansatz mit Protoplasten aufgearbeitet.

12. Synthese von Enzymsubstraten und Derivaten

12.1. Synthese von 4-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA

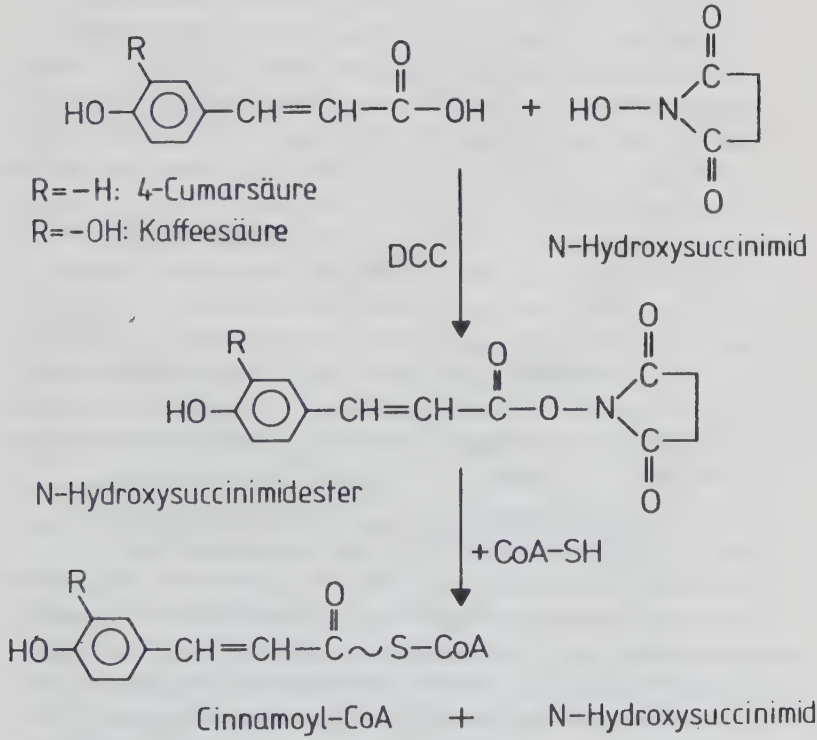


Abb. 6 Reaktionsschema der chemischen Synthese von 4-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA mit Succinimidester als Zwischenprodukte. Nach STÖCKIGT und ZENK (1975)

Die Cinnamoyl-CoA Substrate der CHS, die CoA-Thioester von 4-Cumarsäure und Kaffeesäure wurden chemisch synthetisiert, nach der Methode von STÖCKIGT und ZENK (1975) und persönlicher Mitteilung von Dr. G. Forkmann

(Tübingen). Die genaue Durchführung ist bei SPRIBILLE (1982) beschrieben.
Abb. 6 zeigt das Prinzip der Synthese. Die Hydroxyzimtsäuren wurden zuerst mit N-Hydroxysuccinimid verestert, eine direkte Veresterung mit CoA-SH ist nicht möglich. Die Bildung der N-Hydroxysuccinimidester fand in Dioxan statt unter Einfluß von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC). In einer anschließenden Reaktion in wässriger $NaHCO_3$-Lösung, unter Stickstoffatmosphäre, erfolgt der Austausch von N-Hydroxysuccinimid gegen CoA-SH. Neben Cinnamoyl-CoA entstanden auch zahlreiche andere Produkte, da das reaktive N-Hydroxysuccinimid die Phenol- und Carboxylgruppen der Zimtsäuren angreift. Die Trennung der Reaktionsprodukte erfolgte durch Dünnschichtchromatographie auf Zellulose-Platten (0,1 mm; 20 x 20 cm, Merck, Darmstadt) in Laufmittel IV (siehe 6.1.3.). Die in Frage kommenden, im UV (366 nm) sichtbaren Banden, wurden eluiert und spektrometrisch vermessen. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich der UV-Spektren, mit den von STÖCKIGT und ZENK (1975) angegebenen Daten. Als 4-Cumaroyl-CoA wurde eine im UV (366 nm) dunkelblaue Bande mit einem R_f-Wert von 0,45, als Caffeoyl-CoA eine im UV grünliche Bande mit R_f=0,32 identifiziert.
Die UV-Spektren sind in Abb. 7 dargestellt. Mit Hilfe der von STÖCKIGT und ZENK (1975) ermittelten molaren Extinktionskoeffizienten wurde die gewünschte Konzentration von 200 mM in KPi-Puffer (100 mM; pH 7,0) hergestellt.
Die Ausbeute der Synthesen (bezogen auf CoA-SH) betrug für 4-Cumaroyl-CoA ca. 5 %, für Caffeoyl-CoA etwa 3 %.

12.2. Synthese von Naringeninchalcon

Die Isomerisierung von Naringenin zu Naringeninchalcon erfolgte nach der Methode von MOUSTAFA und WONG (1967), in ähnlicher Weise, wie bei DANGELMAYR (1982) beschrieben.

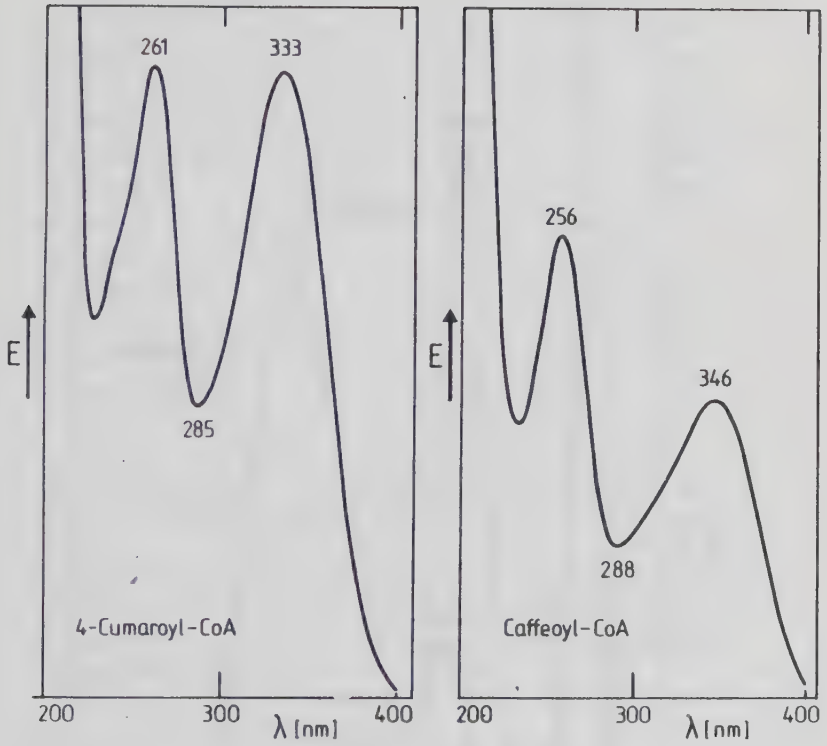


Abb. 7 UV-Spektren der Cinnamoyl-CoA-Syntheseprodukte in Puffer (KPi 100 mM; pH 7,0)

100 mg Naringenin wurde in 20 ml NaOH gelöst und 24 h bei Raumtemperatur verschlossen aufbewahrt. Die orangefarbene, klare Lösung wurde mit HCl (10% w/v) titriert bis das Chalcon als gelber Niederschlag quantitativ ausgefallen war (ca. 7 ml). Danach erfolgte eine Extraktion des Chalcons mit 50 ml Ethylacetat. Der Extrakt wurde im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt. Durch Umkristallisation aus ethanolischer Lösung erhielt man gelbe Kristalle, die in verschlossenen Gefäßen bei -20 °C aufbewahrt wurden. Die UVS-Spektren von Syntheseprodukt (Naringeninchalcon) und Ausgangsprodukt (Naringenin) sind in Abb. 8 dargestellt.

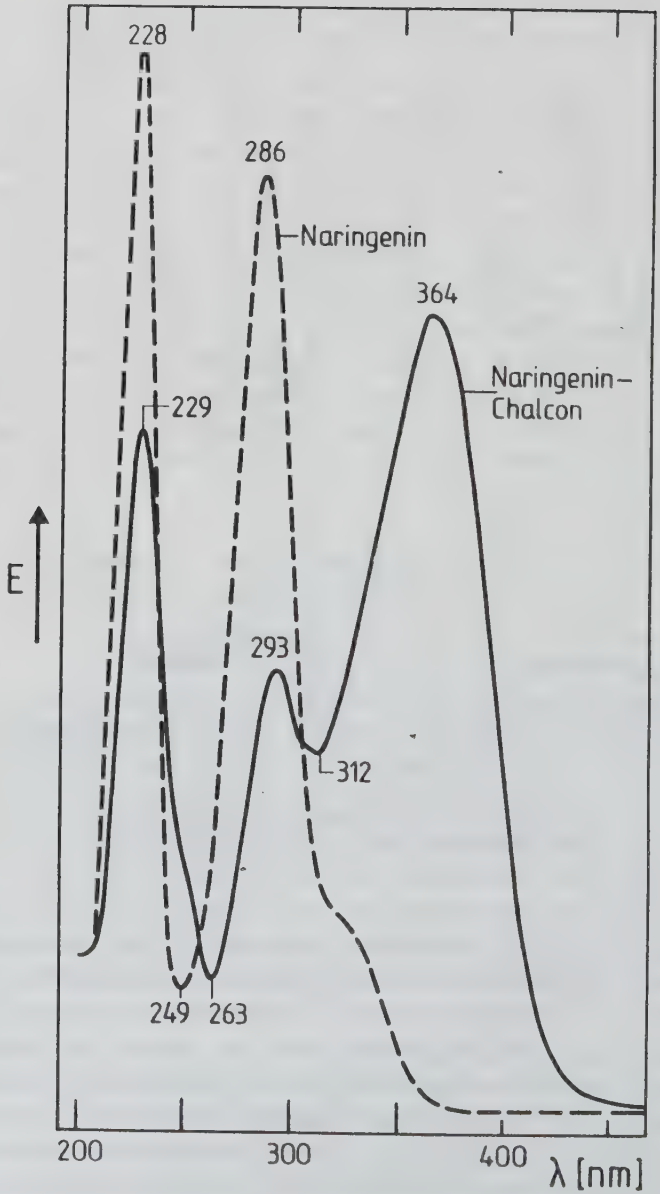


Abb. 8 UVS-Spektren des Syntheseprodukts (Naringeninchalcon) und des Ausgangsprodukts (Naringenin) in EGME

Tab. 3 R_f-Werte der CHS-Substrate und einiger Derivate (Laufmittel siehe 6.1.3)

Substanz	R_f (x 100) in Laufmittel III	IV	V
Malonyl-CoA	2	21	44
3'DP-Malonyl-CoA	12	29	54
Malonyl-4'PP	2	25	50
Malonat	45	68	52
Acetyl-CoA	36	20	37
4-Cumaroyl-CoA	-	40	80
3'DP-4-Cumaroyl-CoA	-	57	81
4-Cumaroyl-4'PP	-	66	79
4-Cumarsäure	87	77	94

12.3. Synthese von 3'-Dephospho-4-Cumaroyl-CoA und 3'-Dephospho-Malonyl-CoA

Die Synthese der in 3'-Position des Adenosins dephosphorilierten CHS-Substrate erfolgte enzymatisch mit 3'-Nucleotidase (EC. 3.1.3.6.) aus *Lolium multiflorum* (Sigma, München).

$$R \sim CoA \xrightarrow[+ H_2O]{\text{3'-Nucleotidase}} 3'\,DP\text{-}R \sim CoA + Pi$$

4-Cumaroyl-CoA (20 nMol) oder (2-^{14}C)-Malonyl-CoA (23,7 nMol; 278 000 dpm) wurden mit 0,2 nkat 3'-Nucleotidase für 60 min bei 37 °C in Bis-Tris/HCl (20 mM; pH 7,0) inkubiert. Die Ansätze wurden chromatographiert auf Zellulose-DC-Platten (0,1 mm; 20 x 20; Merck, Darmstadt) mit Laufmittel IV (siehe 6.1.3.), welches gut die dephosphorilierten von den phosphorilierten Substraten trennt. Tabelle 3 zeigt das Laufverhalten einiger Derivate der CHS-Substrate in verschiedenen Laufmitteln.
Malonyl-CoA und 3'DP-Malonyl-CoA sind auf Grund der UV-Absorption des Adenin-Rests (Maximum bei 259 nm) im kurz-

welligen UV (254 nm) als dunkle Flecken sichtbar. Der Malonyl-Rest konnte zusätzlich über die Radioaktivität lokalisiert werden. Das UV-Spektrum ist für beide identisch und zeigt nur das eine Maximum bei 259 nm (Adenosin). Als Hydroxamsäure-Derivat (LIPMANN und TUTTLE 1945) wurde für beide ein Maximum bei 490 nm bestimmt. Dies gilt auch für Acetyl-CoA.
4-Cumaroyl-CoA und 3'DP-4-Cumaroyl-CoA sind im UV (366 nm) deutlich sichtbar und zeigen identische UV-Spektren (siehe Abb. 7).
Die Elution der Syntheseprodukte erfolgte mit H_2O.

12.4. Synthese von 4-Cumaroyl-4'-phosphopantethein und Malonyl-4'-phosphopantethein

Die Pyrophosphatbindung des CoA-Restes der CHS-Substrate spaltet im stark sauren Milieu (BERGMEYER 1970). Die Spaltprodukte sind Adenosin 3',5'-Diphosphat (3',5'-ADP) und der 4'-Phosphopantethenyl-Rest (-4'PP)(vgl. Abb. 51).

$$R \sim CoA \xrightarrow[+H_2O]{H^+} R \sim 4'PP + 3',5'\text{-ADP}$$

4-Cumaroyl-CoA (20 nMol) bzw. [2-^{14}C]-Malonyl-CoA (23,7 nMol; 278 000 dpm) wurden für 60 min bei 30 °C in HCl (1 N) inkubiert und anschließend chromatographiert (siehe 12.3.). Die R_f-Werte sind in Tabelle 3 angegeben.

Malonyl 4'PP konnte nur mit Hilfe seiner Radioaktivität lokalisiert werden, der UV-absorbierende Teil (Adenin) fehlte. Als Nebenprodukt der sauren Hydrolyse konnte Malonsäure identifiziert werden, mittels Cochromatographie mit unmarkierter Malonsäure, die durch Besprühen mit Bromphenolblau (0,04 % w/v in Ethanol; pH 8,0) lokalisiert wurde.
Abbildung 9 zeigt den zeitlichen Verlauf der Hydrolyse von Malonyl-CoA. Malonyl-CoA, Malonyl-4'PP und Malonat wurden gut getrennt in Laufmittel IV (Abbildung 10).

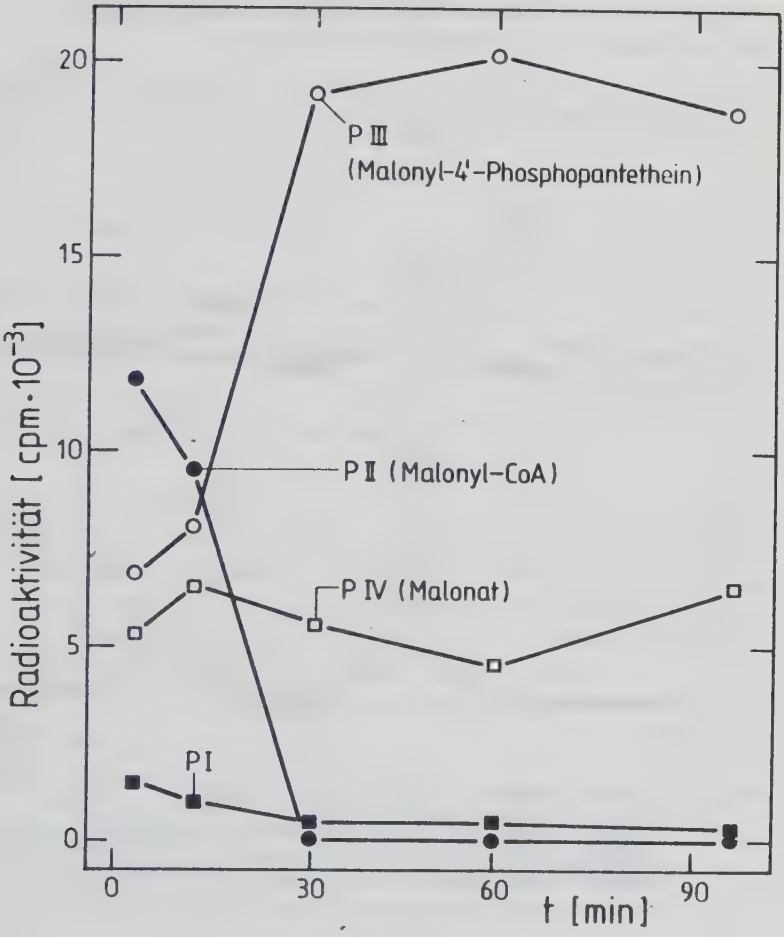


Abb. 9 Hydrolyse von ^{14}C-Malonyl-CoA in 1 N HCl bei 30 °C. Abbruch und Chromatographie (Laufmittel IV, siehe 6.1.3.) nach verschiedenen Zeiten
P I : Nicht identifizierte Radioaktivität auf Startlinie
P II : Malonyl-CoA
P III : Malonyl-4'-phosphopantethein
P IV : Malonat

4-Cumaroyl-CoA und 4-Cumaroyl-4'PP sind beide sichtbar im UV bei 366 nm, bei 254 nm dagegen nur noch 4-Cumaroyl-CoA.

Die Thioesterbindung von 4-Cumaroyl-4'PP absorbiert ebenso bei 333 nm wie die von 4-Cumaroyl-CoA, das Maximum bei 260 nm (Adenin) ist dagegen verschwunden.

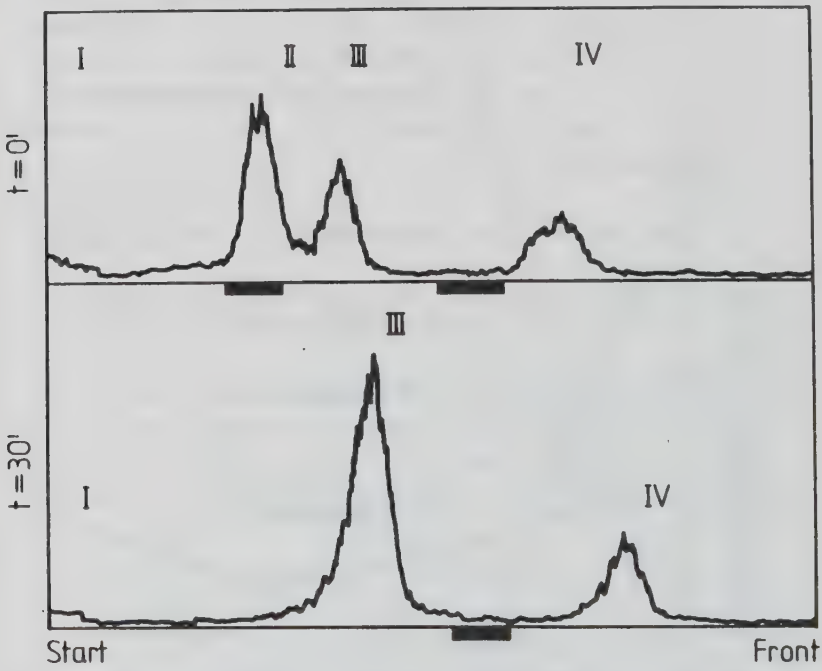


Abb. 10 Chromatographie der Hydrolyseprodukte von ^{14}C-Malonyl-CoA (II) nach Inkubation in 1 N HCl für 0 min (oben) und 30 min (unten). Verwendet wurde Laufmittel IV (siehe 6.1.3.). Die Balken repräsentieren dunkle Flecken im UV (254 nm), verursacht von Adenin-Resten. Produkte I - IV siehe Abb. 9

13. Verbrauchsmaterial und Chemikalien

13.1. Verbrauchsmaterial

Amicon, Osterhout, Holland

Membranfilter PM 10 000 für Ultrafiltration

Merck, Darmstadt
DC-Zellulose-Platten (0,1 mm; 20 x 20 cm)

Sartorius, Göttingen
Membranfilter SM 16534 K und N 13307, Glasfaserfilter SM 13400

13.2. Chemikalien [1]

Amersham Buchler, Braunschweig
(2- ^{14}C)-Malonyl-CoA

Biotronik, Frankfurt
Aminosäurenstandard, Benson Typ A-N-B

Böhringer, Mannheim
Adenosin 5'-diphosphat (ADP), Adenosin 5'-monophosphat (AMP), Adenosin 2':3'-monophosphat (cyclisch), Adenosin 3':5'-monophosphat (cyclisch), Adenosin 5'-triphosphat (ATP), CoA-SH, Grad II (freie Säure), Glucose 6-phosphat (Na-Salz) Guanosin 3'(2')-monophosphat, RNA (aus *E. coli*)

Fluka, Neu-Ulm
NADP

Merck, Darmstadt
L-Asparagin, L-Cystein, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dithiothreitol (DTT), Ethylenglycolmonomethylether (EGME), GA_3 (Auxillin ®), L-Glutamin, Lanthan(III)chlorid , Malonsäure, Ninhydrin, L-Phenylalanin, Phtaldialdehyd, Quercetin, Titriplex III (Na-EDTA), Tris, t-Zimtsäure

1) Die Nucleotide, soweit nicht anders angegeben, wurden als Na-Salze bezogen

Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), N-Hydroxysuccinimid

Pharmacia, Uppsala, Schweden
DEAE-Sephacel, Eichproteine(LMW), Sephadex G-25(fine)

Roth, Karlsruhe
Chlorogensäure, 4-Cumarsäure, Cyanidin 3,5-diglucosid (Cyaninchlorid), Dihydroquercetin, Eriodictyol, Eriodictyolchalcon (3,4,2',4',6'-Pentahydroxychalcon), Kaffeesäure, Naringenin

Serva, Heidelberg
Adenosin 2'-monophosphat (freie Säure), Dowex 1X2 (mesh 200-400), 2-Mercaptoethanol, Triethanolamin

Sigma, München
Acetyl-CoA (Li-Salz), Adenosin 3',5'-diphosphat(3',5'-ADP), Adenosin 3'-monophosphat (Adenylsäure, 3'-AMP), Bis-Tris, BSA (Fraktion V), Ca^{2+}-Ionophor A 23 187, Coomassie Brilliant Blue G-250, 3'-Dephospho-CoA-SH, DNA (Kalbsthymus), Hydroxylamin, Malonyl-CoA (Li-Salz), MES, β-Mercaptoethylamin (Cysteamin), 3'-Nucleotidase EC.3.1.3.6. (aus *Lolium multiflorum*), D- Pantethein (Ca-Salz), D- Pantothensäure (Ca-Salz)

Zinsser, Frankfurt
Unisolve 1

14. Abkürzungen

ADP	Adenosin 5'-diphosphat
3',5'-ADP	Adenosin 3',5'-diphosphat
3'-AMP	Adenosin 3'-monophosphat
L-AOPP	L-α-Aminooxy-β-phenylpropionsäure

ATP	Adenosin 5'- triphosphat
Bis-Tris	Bis(2-hydroxymethyl)imino-tris(hydroxy-methyl)methan
BSA	Rinderserumalbumin
CAH	trans-Zimtsäure 4-Hydroxylase (EC. 1.14.13.11.)
CCL	Hydroxyzimtsäure : Coenzym A-Ligase (EC. 6.2.1.12.)
CGT	Cyanidin 3-O-Glucosyltransferase
CHI	Chalconisomerase (EC. 5.5.1.6.)
CHS	Chalconsynthase
CoA,CoA-SH	Coenzym A
cpm	Impulse pro Minute
CQT	Hydroxyzimtsäure-Coenzym A : Chinasäuretrans-ferase
2,4 D	2,4 Dichlorphenoxyessigsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DC_b	*Daucus carota*, anthocyanhaltige Zellinie
DC_w	*Daucus carota*, anthocyanfreie Zellinie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DEAE	Diethylaminoethyl
DHQ	Dihydroquercetin
DMSO	Dimethylsulfoxid
3'-DP	3'-Dephospho
dpm	Zerfälle pro Minute
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	1,4 Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGME	Ethylenglycolmonomethylether
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERI	Eriodictyol
FG	Frischgewicht
FPLC	Fast-protein(peptid, polynucleotid)-liquid-chromatography
FS	Fettsäuresynthetase
GA_3	Gibberellinsäure
GABA	γ-Aminobuttersäure
G6PDH	Glucose 6-phosphat-Dehydrogenase (EC.1.1.1.49.)

IAA	Indol(yl) 3-essigsäure
K_m	Michaelis-Konstante
KPi	Kaliumphosphat
LMW	Low-Molecular-Weight
ME	2-Mercaptoethanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
m-RNA	messenger-Ribonucleinsäure
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NAR	Naringenin
NP	Nebenprodukt
Pi	anorganisches Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAL	Phenylalanin Ammonium-Lyase (EC. 4.3.1.5.)
PAP	Peroxydase-anti-Peroxydase
4'PP	4'-Phosphopantethenyl
QUE	Quercetin
RNA	Ribonucleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
TG	Trockengewicht
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

III ERGEBNISSE

1. Enzyme des Anthocyanstoffwechsels in Blüten der Wilden Möhre

1.1. Das Versuchsobjekt

Die heimische Wilde Möhre (*Daucus carota*) ist eine zweijährige Pflanze, die bei uns in der Zeit Juli bis September zum Blühen kommt. Die Dolde ist häufig differenziert in eine oder mehrere dunkelviolett gefärbte Zentralblüte(n) ("Mohrenblüte") und weiße Randblüten. Auch hinsichtlich Anatomie und Morphologie unterscheiden sich diese Blüten erheblich. Die Differenzierung in anthocyanhaltige und anthocyanfreie Blütentypen erinnert an die Situation in Kalluskulturen, bei denen durch GA_3-Gabe die Anthocyansynthese blockiert werden konnte. Daher war es naheliegend, die Differenzierung der Blüten auf dem Niveau extrahierbarer Enzymaktivitäten zu untersuchen und mit den bei Kalluskulturen erzielten Ergebnissen zu vergleichen.

1.2. Vergleich der Enzymaktivitäten PAL, CHS und CHI aus violetten und weißen Blüten

Die Ergebnisse wurden in Abbildung 11 zusammengefaßt. Es wurden die spezifischen Enzymaktivitäten verglichen, wobei die Aktivitäten der violetten Blüten auf 100 % normiert wurden.
Die PAL-Aktivität in beiden Blütentypen war beträchtlich. In weißen Blüten war sie etwas höher. Dagegen war die CHS-Aktivität in Extrakten aus weißen Blüten unter Standardbedingungen nicht nachweisbar, während sie in Extrakten aus violetten Blüten eine hohe spezifische Aktivität besaß. Durch Erhöhung der Extraktmenge im Test konnte auch eine geringe Aktivität mit weißen Blüten gemessen werden (2 %), diese lag allerdings nur wenig über der Nachweisgrenze.

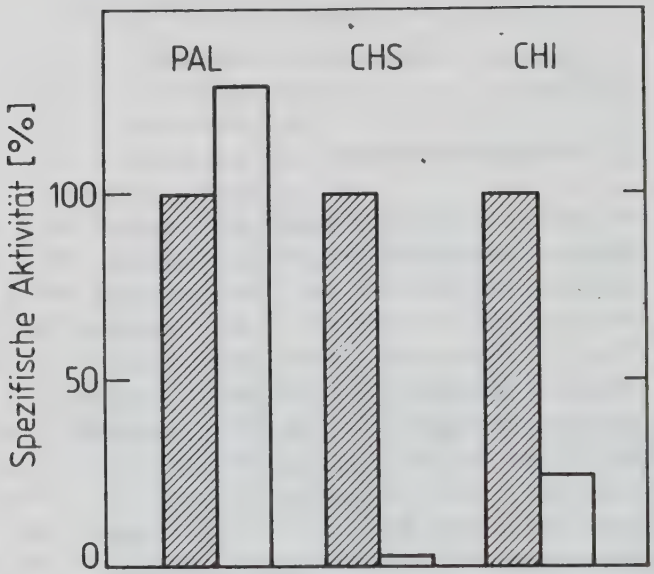


Abb. 11 Vergleich der spezifischen Enzymaktivitäten in Blüten von *Daucus carota*. Weiße Randblüten (□), violette Zentralblüten (▨). Die Aktivitäten der violetten Blüten wurden als 100 % gesetzt
PAL (100 %) = 55,6 µkat/kg
CHS (100 %) = 0,85 µkat/kg
CHI (100 %) = 437 $\Delta E_{385}/s \cdot kg$
(Aus HINDERER et al. 1983)

Tab. 4 Vergleich der spezifischen Enzymaktivitäten aus weißen Blüten mit denen aus anthocyanfreien Kalluskulturen (DC_w). Angaben in % der Aktivitäten aus anthocyanhaltigen Blüten bzw. Kalluskulturen (DC_b)

Enzymaktivität	weiße Blüten	DC_w-Kallus
PAL (%)	125	15 (a
CHS (%)	2	0 (b
CHI (%)	24	3 (b

a) HEINZMANN und SEITZ (1974)
b) HINDERER (1982)

Tab. 5 Produktbildung im CHS-Standardtest mit Enzymextrakt aus violetten Blüten unter verschiedenen Bedingungen

Testbedingung	Totale Radioaktivität (cpm)	Naringenin (cpm)
Komplett	3400	2174
Extrakt gekocht	20	0
- 4-Cumaroyl-CoA	170	0
- ME	3055	2644
- BSA	145	37

Auch die CHI-Aktivität war in Extrakten aus weißen Blüten deutlich geringer, aber im Gegensatz zu der CHS gut nachweisbar.
In Tabelle 4 wurde die Situation in Blüten verglichen mit der in Kalluskulturen. Der Vergleich der Enzymaktivitäten liefert deutliche Hinweise, daß auch im Falle der Blüten die CHS bei der Regulation der Differenzierung in pigmentierte und pigmentfreie Blüten eine Schlüsselrolle hat, wie dies auch bei Gewebekulturen für die Regulation durch GA_3 vermutet wird. Im Gegensatz zu Ergebnissen mit Kalluskulturen, zeigten Extrakte aus weißen Blüten im CHS-Test keine signifikante Hemmaktivität (Mischexperimente).

1.3. Eigenschaften der CHS aus Blüten

Eine teilweise Charakterisierung der CHS aus der Wilden Möhre soll eine spätere Argumentation, die auf Eigenschaften gereinigter CHS aus Suspensionskulturen basiert, unterstützen. Für die Bestimmung der CHS-Aktivität wurden zwei Methoden angewendet (siehe II.6.1.). Die gesamte, durch Ethylacetat extrahierbare Radioaktivität wurde bestimmt und verglichen mit der Radioaktivität von Flavanon, das durch Chromatographie isoliert, identifiziert und quantifiziert wurde. Chalcon trat unter diesen Test-

bedingungen nicht auf, da es spontan zu Flavanon cyclisiert (SÜTFELD und WIERMANN 1980).
Tabelle 5 zeigt einen Vergleich der beiden Methoden unter verschiedenen Testbedingungen und zugleich den Einfluß der verschiedenen Komponenten des Standardtests auf die CHS-Aktivität. Der Unterschied zwischen beiden Methoden kommt durch die Bildung von nicht-Flavanon-Produkten (Nebenprodukte) zustande, die nicht identifiziert werden konnten. Unter Standardbedingungen waren ca. 60 - 70 % der gebildeten (und Ethylacetat-löslichen) Produkte Naringenin. Mit gekochtem Extrakt und ohne 4-Cumaroyl-CoA wurden keine Produkte gebildet. Überraschend war, daß die gesamte Aktivität von BSA abhing. Nur in Anwesenheit von BSA im Test (1 % w/v) wurde Naringenin gebildet. Positive Wirkung von BSA auf Aktivität und Stabilität der CHS fanden auch SALEH et al. (1978) und SCHRÖDER et al. (1979a).
In Abwesenheit von 2-Mercaptoethanol (ME), welches bei Aufarbeitung und Test in einer Konzentration von 1,4 mM eingesetzt wurde, erhöhte sich der Anteil von Naringenin an den gesamten Produkten auf 85 - 90 %. Die Gesamtradioaktivität nahm dabei leicht ab. Dies bedeutet, daß ME die Bildung von Nebenprodukten fördert, eine Eigenschaft der CHS, über die schon mehrfach berichtet wurde (KREUZALER und HAHLBROCK 1975a, SPRIBILLE und FORKMANN 1982a, WHITEHEAD und DIXON 1983).
Ein wesentlicher Aspekt bei der Charakterisierung von CHS ist die Substratspezifität. Die CHS aus Blüten von *Daucus carota* bildet Eriodictyol wenn 4-Cumaroyl-CoA durch Caffeoyl-CoA im Test ersetzt wird. Die CHS hatte für beide Substrate verschiedene pH-Optima (Abbildung 12). Mit 4-Cumaroyl-CoA wurde ein pH-Optimum von 7,5, mit Caffeoyl-CoA dagegen 6,3 ermittelt, jeweils mit beiden Methoden. Aus Abbildung 12 wird auch ersichtlich, daß mit Caffeoyl-CoA als Substrat der Anteil von Flavanon (Eriodictyol) deutlich geringer war (ca. 50 %), also ver-

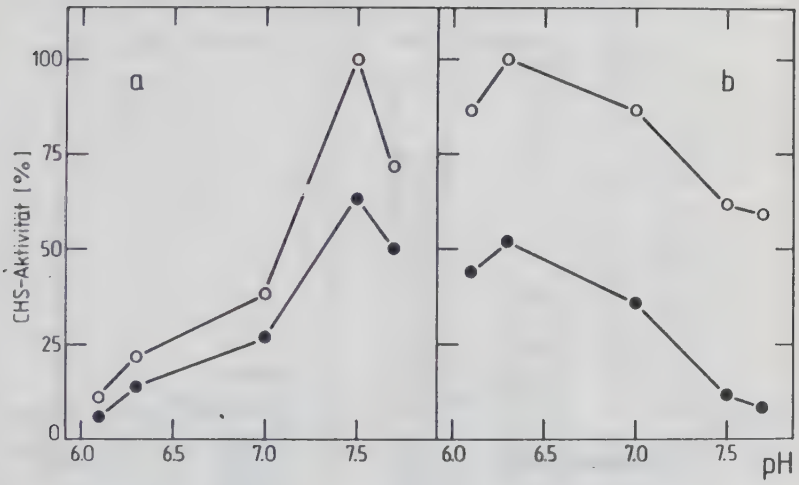


Abb. 12 pH-Abhängigkeit der CHS-Aktivität in % des Maximums
a) Mit 4-Cumaroyl-CoA als Substrat: Totale Radioaktivität (○), Naringenin (●)
b) Mit Caffeoyl-CoA als Substrat: Totale Radioaktivität (○), Eriodictyol (●)

stärkt Nebenprodukte gebildet wurden. Da für die Ermittlung der pH-Optima für die beiden Substrate verschiedene Enzymaufarbeitungen eingesetzt wurden, war ein Vergleich der absoluten Enzymaktivitäten nicht möglich. Dazu wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, welches in Abbildung 13 dargestellt ist. Die Enzymaktivitäten wurden in den beiden pH-Optima ermittelt. Bei pH 7,5 hatte die CHS eine hohe Spezifizität für 4-Cumaroyl-CoA, die Rate der Eriodictyol-Bildung beträgt nur 12 % im Vergleich zur Naringenin-Bildung, während bei pH 6,3 die Spezifität geringer zu werden scheint. Aber auch bei pH 6,3 wird 4-Cumaroyl-CoA schneller umgesetzt.

In ihrem Substratverhalten stimmt die CHS aus Blüten völlig überein mit CHS aus Kalluskulturen (HINDERER 1982). Die Möglichkeit, daß Caffeoyl-CoA ein natürliches Substrat

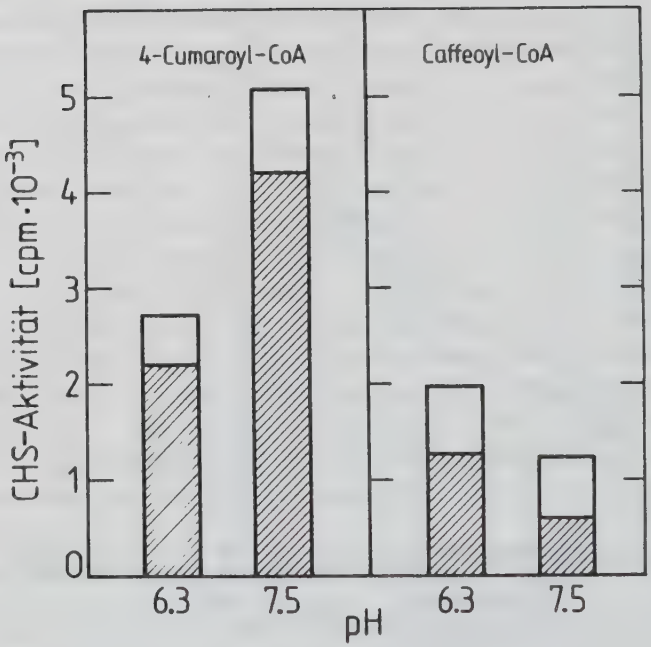


Abb. 13 Vergleich der CHS-Aktivitäten mit 4-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA als Substrat bei pH 6,3 und 7,5. Totale Radioaktivität (□), Flavanon (▨)

der CHS in vivo ist, kann mit diesen Ergebnissen allerdings noch nicht ausgeschlossen werden.
In Abbildung 14 sind verschiedene Radiochromatogramme dargestellt, welche die wichtigsten Aspekte der CHS aus Blüten zeigen. Die Naringenin-Bildung bei pH 7,5, die Eriodictyolbildung bei 6,3 und keinerlei signifikante Naringenin-Bildung wenn, Extrakte aus weißen Blüten als Enzymquelle verwendet wurden.

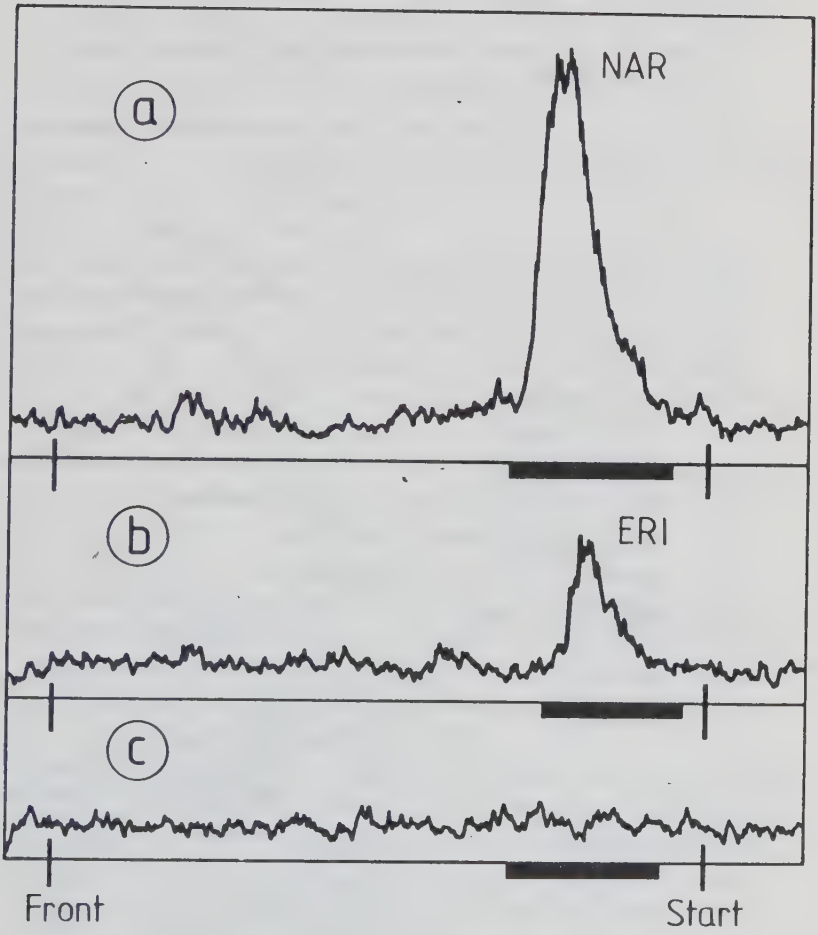


Abb. 14 Radiochromatogramme der Reaktionsprodukte verschiedener CHS-Testansätze nach Chromatographie in Laufmittel I (siehe II.6.1.3.)

a) Test mit Extrakt aus violetten Blüten bei pH 7,5 und 4-Cumaroyl-CoA als Substrat
b) Test mit Extrakt aus violetten Blüten bei pH 6,3 und Caffeoyl-CoA als Substrat
c) Test mit Extrakt aus weißen Blüten bei pH 7,5 und 4-Cumaroyl-CoA als Substrat

Die schwarzen Balken markieren die unter UV (366 nm) sichtbaren, co-chromatographierten Falvanone

2. In vivo-Versuche mit Suspensionskulturen

2.1. Charakterisierung der Anthocyan-produzierenden Suspensionskultur

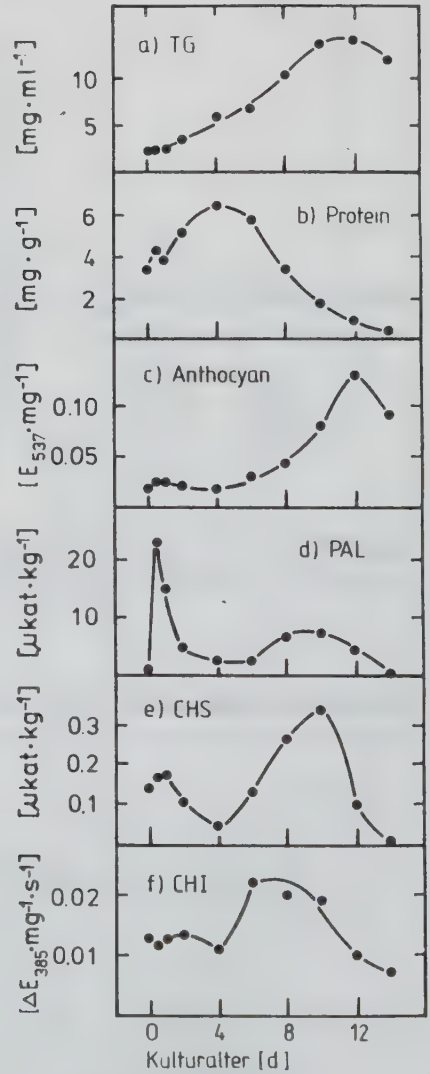


Abb. 15 Wachstum, Anthocyangehalt und spezifische Enzymaktivitäten von PAL, CHS und CHI, einer Anthocyan-produzierenden Suspensionskultur

(aus HINDERER et al. 1984)

Damit Ergebnisse aus in vivo-Experimenten richtig interpretiert werden können, muß das normale Verhalten der Zellkultur in Bezug auf Wachstum und Verlauf der Enzymaktivitäten bekannt sein.
Suspensionskulturen von *Daucus carota* wurden bereits von NOÉ et al. (1980) hinsichtlich Wachstum, Anthocyanakkumulation und PAL-Aktivität ausführlich charakterisiert. Die hier verwendeten Suspensionskulturen zeigten identisches Verhalten.
Das Wachstum der Kultur, gemessen als Trockengewicht, steigt stetig an, bis 12 d nach dem Animpfen, um dann wieder abzufallen (Abb. 15a). Der Verlauf der Frischgewichtskurve war dem gegenüber um einen Tag nach rechts verschoben (ohne Abb.), die Zellzahl verläuft ähnlich wie das Trockengewicht (NOÉ et al. 1980).
Der Gehalt an löslichen Proteinen der Zellen (bezogen auf Frischgewicht) steigt 4 d lang an, um dann rasch abzufallen (Abb. 15b). Der Abfall kommt zustande durch Verminderung der Proteinsyntheserate (NOÉ 1982), durch zunehmendes Frischgewicht pro Zelle und vermutlich durch erhöhte Proteolyse, denn der Gehalt an freien Aminosäuren nimmt in dieser Phase zu (siehe 2.4.1.). Das Maximum der Anthocyangehalte (bezogen auf Trockengewicht) liegt bei 12 d nach dem Animpfen (Abb. 15c).
Die Enzymaktivitäten im Verlauf der Kulturperiode wurden für PAL, CHS und CHI bestimmt. Die PAL zeigt ein starkes Maximum bei 12 h, den sogenannten Verdünnungseffekt, der sich aber nicht auf den Anthocyangehalt auswirkt. Eher scheint das relative Maximum am 10. Tag mit der Anthocyansynthese in Verbindung zu stehen (Abb. 15d).
Die CHS erreicht ein deutliches Maximum am 10. Tag, 2 d vor dem maximalen Anthocyangehalt (Abb. 15e), in dieser Phase ist auch die CHI aktiv (Abb. 15f).
Es ist auffällig, daß die Enzymaktivitäten erst gegen Ende der Wachstumsphase ansteigen und die Anthocyanakkumulation 2 d verzögert nachfolgt, mit einem starken

Tab. 6 Wachstum, Anthocyangehalt und spezifische Aktivitäten 10 d alter Suspensionskulturen nach Gabe verschiedener GA_3-Konzentrationen am 0. Tag. Angaben in % der Kontrolle ohne GA_3

GA_3 (µM)	0	0,3	3	30	300
FG (%)	100	78	95	80	33
TG (%)	100	82	84	72	44
Protein (%)	100	125	96	108	263
Anthocyan (%)	100	61	49	34	23
PAL (%)	100	41	45	43	64
CHS (%)	100	67	50	37	15
CHI (%)	100	67	68	47	46
G6PDH (%)	100	86	89	92	88
Hemmung CHS (%)[a]	126	125	113	98	95

a) Getestet in Mischexperimenten mit partiell gereinigter CHS. Kontrolle ohne Extraktzugabe = 100 %. Es wurden gleiche Proteinmengen zugesetzt (37 µg)

Anstieg zwischen dem 8. und 12. Tag. In dieser Phase ist der Proteingehalt sehr niedrig. Diese Suspensionskultur ist ein gutes Beispiel für die Trennung von Wachstum und Cyto-Differenzierung (Anthocyan), Primär- und Sekundärstoffwechsel sind während unterschiedlichen Phasen aktiv.

2.2. Versuche mit Gibberellinsäure

2.2.1. Wirkung über die gesamte Kulturperiode

Ausgehend von dem ermittelten Kulturalterverlauf der Enzymaktivitäten, wurde den Kulturen am Überimpftag verschiedene Konzentrationen an GA_3 zugesetzt und die einzelnen Parameter nach 10 d bestimmt. Sämtliche ermittelten Daten sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

GA_3 hat auf das Wachstum bis zu einer Konzentration von 30 µM nur einen geringen Einfluß, bei höheren Konzentrationen (300 µM) tritt allerdings eine starke Wachstumshemmung ein. Durch Zugabe von 300 µM GA_3 fiel der pH-Wert des Mediums von 4,5 auf 4,2, dies trug sicher auch zur Wachstumshemmung bei. Da die Proteingehalte der Zellen nach dem 4. Tag stetig absinken, führt Wachstumsverzögerung zu höheren Proteinwerten (am 10. Tag).
Die Dosisabhängigkeit der GA_3-Wirkung (SCHMITZ und SEITZ 1972) auf die Anthocyanakkumulation bei Kalluskulturen wurde auch für Suspensionskulturen gefunden, mit einer halbmaximalen Hemmung bei 3 µM GA_3, dieser Wert ist 300 mal größer als der für Kalluskulturen. Zu demselben Resultat kam NOÉ (1980).
Auf die Enzymaktivitäten des Anthocyanstoffwechsels hat GA_3 einen starken Einfluß, während die Aktivität der G6PDH, als Beispiel eines Enzyms aus dem Primärstoffwechsel, kaum verändert wurde.
In Abb. 16 sind die Enzymaktivitäten und die Anthocyanwerte zum besseren Vergleich graphisch dargestellt. Es wird deutlich, daß die CHS-Aktivität sowohl mit der GA_3-Konzentration als auch mit den Anthocyanwerten korreliert war (Abb. 16a und c). Dagegen wurden PAL und CHI nicht unter ein Niveau von 40 % gehemmt, die PAL-Aktivität stieg bei höheren Konzentrationen sogar wieder an (Abb. 16b und d). Die CGT, ein Enzym das einen späteren Schritt der Anthocyansynthese katalysiert, wurde durch GA_3 nicht gehemmt (HINDERER et al. 1984).
In Mischexperimenten wurde versucht, eine mögliche Induktion des "Inhibitors" der CHS, der in DC_w-Kallus-Kulturen auftrat, nachzuweisen (Tab. 6). Die Ergebnisse lassen keine Schlüsse zu; ein nicht additives Verhalten, mit Tendenz einer abnehmenden Gesamtaktivität war zwar zu erkennen, aber deutliche Hemmung wie mit Extrakten aus DC_w-Kallus trat nicht auf.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen über die Wirkung von GA_3 über die gesamte Kulturperiode, wurde eine GA_3-Konzentration von 30 µM für weitere Experimente und für die Dauerkultivierung einer anthocyanfreien Suspensionskultur (w_1) festgelegt.

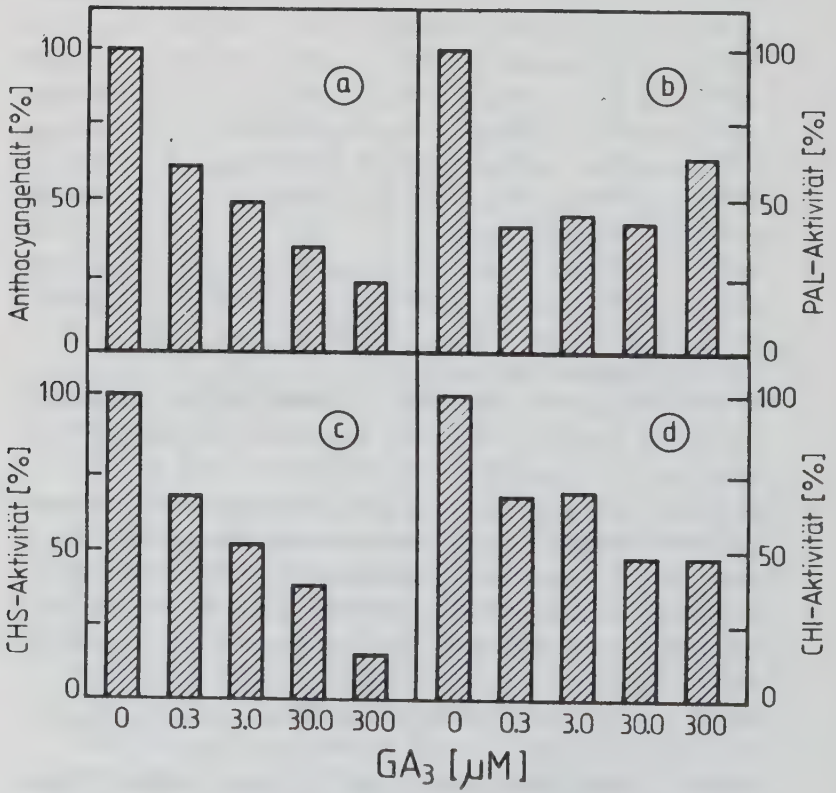


Abb. 16 Wirkung von GA_3 auf Anthocyangehalt und spezifische Enzymaktivitäten von PAL, CHS und CHI, 10 d nach Start der Kultur in GA_3-haltigen Nährmedien. Angaben in Prozent der Kontrollen ohne GA_3
a) Anthocyangehalt, b) PAL, c) CHS, d) CHI
(aus HINDERER et al. 1984)

2.2.2. Supplementationsexperimente [1]

Durch Fütterung von Anthocyanvorstufen aus dem Flavonoid-Stoffwechsel, sollte die Schlüsselrolle der CHS bei der GA_3-Wirkung demonstriert werden. Dabei stand die Beantwortung folgender Fragen im Vordergrund:

- *Sind spätere enzymatische Schritte (nach CHS und CHI) limitierend bei der Drosselung der Anthocyan-Synthese durch GA_3 ?*
- *Erfolgt eine 3'-Hydroxylierung auf der C_{15}-Stufe ?*
- *Werden die Enzymaktivitäten in vivo beeinflußt durch Flavonoide (Feedback-Regulation) ?*

Die Kulturen erhielten beim Animpfen 30 µM GA_3. Nach 8 d wurden die Flavonoide zugesetzt in einer Endkonzentration von 100 µM und mit 0,2 % (v/v) DMSO. Als Vorstufen wurden verwendet: Naringenin (NAR), Eriodictyol (ERI), Dihydroquercetin (DHQ) und als zusätzliche Kontrolle das Flavonol Quercetin (QUE), welches nicht als Vorstufe der Anthocyane gilt (SEYFFERT 1982). Anthocyangehalt und spezifische Enzymaktivitäten von PAL und CHS wurden 48 h nach Gabe der Flavonoide bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt und auf die Kontrolle ohne GA_3 und ohne DMSO (ungehemmt) bezogen. Die Änderungen gegenüber der Kontrolle mit GA_3 und mit DMSO zeigen die Wirkung der Flavonoide. Die übrigen Kontrollen zeigen den Effekt von GA_3 bzw. DMSO allein.

1) Die Supplementationsexperimente wurden in Zusammenarbeit mit meiner Laborkollegin Maike Petersen durchgeführt. Für ihre tatkräftige Unterstützung möchte ich mich herzlich bedanken

Tab. 7 Anthocyangehalt und Enzymaktivitäten von GA_3-behandelten Zellen nach Zugabe verschiedener Flavonoide (100 µM). Angaben in Prozent der Kontrolle ohne GA_3 und ohne DMSO. Einzelheiten siehe II.10.2.

	+ GA_3 (30 µM) + DMSO (0,2 %)					Kontrollen		
	Kontrolle	+NAR	+ERI	+DHQ	+QUE	+GA_3 -DMSO	-GA_3 +DMSO	-GA_3 -DMSO
Anthocyan (%)	37	45	56	74	31	37	57	100
PAL (%)	60	61	49	75	52	66	84	100
CHS (%)	26	26	12	24	19	28	74	100

Mit NAR, ERI und DHQ konnte die Anthocyansynthese erheblich gesteigert werden, während QUE wie erwartet unwirksam blieb. Die größte Zunahme bewirkte DHQ, eine Vorstufe, die sehr dicht bei Cyanidin liegt. Aber auch die Steigerungen mit NAR und ERI waren deutlich. Die Effekte waren mit bloßem Auge zu sehen. Die Enzyme PAL und CHS blieben gehemmt, ein wichtiger Gesichtspunkt bei diesem Experiment. Im Falle von ERI wurden die Enzyme scheinbar zusätzlich gehemmt, dieser Effekt trat nur in dem dargestellten Experiment auf und war nicht signifikant.Dasselbe gilt für die Steigerung der PAL durch DHQ.
Der Vergleich der Kontrollen untereinander zeigt die Wirkung von GA_3 und DMSO. GA_3 bewirkte wiederum starke Hemmung der CHS und eine deutlich geringere Hemmung der PAL-Aktivität. Es war überraschend, daß DMSO in dieser geringen Konzentration einen so starken Effekt auf Anthocyan und Enzymaktivitäten hervorrief. DMSO störte aber weder die Hemmung durch GA_3 noch den Einbau der Flavonoide. Der Vorteil von DMSO lag darin, daß konzentrierte Stammlösungen der schlecht wasserlöslichen Flavonoide hergestellt werden konnten. Damit wurde die sterile Zugabe der Substanzen sehr vereinfacht. Außerdem bewirkt DMSO durch Erhöhung der Membranpermeabilität

möglicherweise eine raschere Aufnahme der Flavonoide (FRITSCH und GRISEBACH 1975).
Die effektivere Wirkung von DHQ im Vergleich zu NAR und ERI könnte entweder mit einem zusätzlichen, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt auf der Stufe der Flavanon 3-Hydroxylase (FORKMANN et al. 1980, BRITSCH et al. 1981) oder mit der unterschiedlichen Löslichkeit in Wasser bzw. Kulturmedium erklärt werden.
Das Anthocyanmuster nach der Supplementation war in allen Fällen identisch, nur Cyanidin-glucoside wurden nachgewiesen (HINDERER et al. 1984). Im Falle von Naringenin, das eine Hydroxylgruppe weniger am B-Ring aufweist als Cyanidin, muß eine 3'-Hydroxylierung erfolgt sein. Dies war ein indirekter Nachweis für die Existenz einer Flavonoid 3'-Hydroxylase, ein Enzym, das in Blüten vieler Arten, aber auch in Petersilie-Zellkulturen nachgewiesen wurde (FORKMANN et al. 1980, SPRIBILLE und FORKMANN 1982a, DOODEMANN et al. 1982, HAGMANN et al. 1983).
Ein wichtiger Aspekt bei solchen Supplementationsexperimenten ist die Geschwindigkeit des Vorgangs. Langsamer oder stark verzögerter Einbau könnte durch unkontrollierte sekundäre Reaktionen erfolgen, über Abbau oder Umbau der Metaboliten. Bei dem in Abbildung 17 dargestellten Versuch wurde der zeitliche Verlauf mit DHQ als Vorstufe bestimmt. Dabei wurde eine Kultur verwendet, die seit 7 Passagen in GA_3-haltigem Medium kultiviert wurde und einen sehr geringen Anthocyangehalt besaß. Die Anthocyansynthese begann kurze Zeit nach Zugabe von DHQ. Bereits nach 4 h war eine deutliche Steigerung zu sehen. Nach 34 h war der Prozess gesättigt. Vermutlich steht zu dieser Zeit kein DHQ mehr zur Verfügung. Die Steigerung gegenüber den Kontrollen betrug 146 %.
Die Supplementationsexperimente haben gezeigt, daß in der Tat die Blockierung der Anthocyansynthese durch GA_3 auf der Stufe der CHS erfolgt. Im Gegensatz zur CHS-Aktivität, ist die Aktivität der Folgeenzyme auch bei längerer GA_3-Behandlung noch vorhanden. Zusätzlich konnte eine 3'-Hydroxylierung auf der Flavonoid-Stufe nachgewiesen werden.

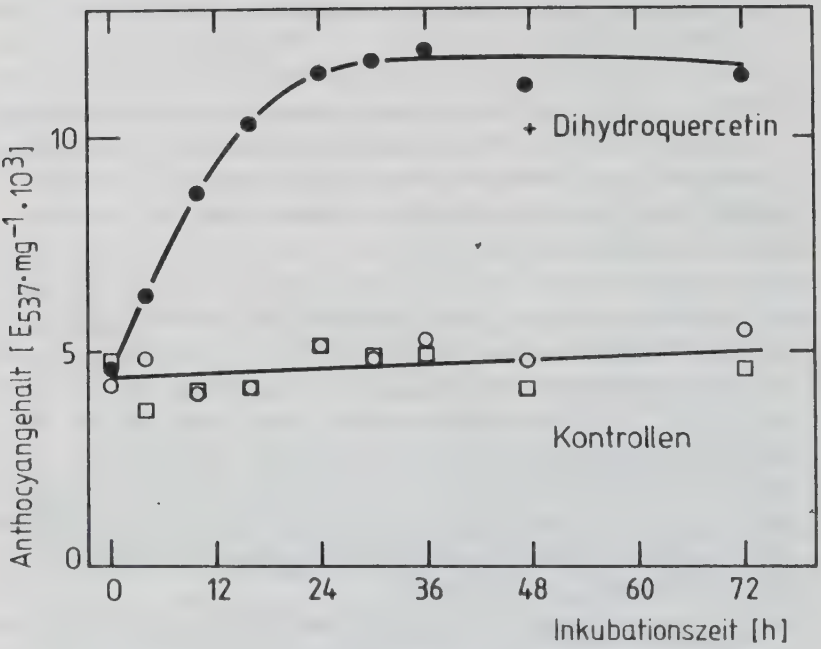


Abb. 17 Kinetik der Supplementation der Anthocyansynthese mit DHQ als Vorstufe (●) bei 8 d alten GA_3-behandelten Suspensionszellen. Kontrolle mit DMSO (○) ohne DMSO (□). Konzentrationen: DHQ (100 µM), GA_3 (30 µM), DMSO (0,2 %). (Einzelheiten siehe II.10.2.) (aus HINDERER et al. 1984)

PAL und CHS werden durch die Flavonoide in vivo nicht wesentlich beeinflußt, sie bleiben gehemmt.

2.2.3. Schnelle Wirkung

Bei diesen Experimenten wurde GA_3 nicht zu Beginn der Kulturperiode, sondern erst 7 d später zugesetzt. In dieser Phase erfolgt die Aktivierung des Sekundärstoffwechsels, Enzymaktivitäten beginnen anzusteigen und Anthocyan akkumuliert (vgl. Abb. 15). Anthocyan und Wachstumsparameter wurden 5 d lang kontinuierlich verfolgt, bis zum 12. Tag. Die Enzym-

Tab. 8 Wachstum und Anthocyangehalte 12 d alter Suspensionskulturen nach Gabe verschiedener GA_3-Konzentrationen 5 d vorher. Spezifische Enzymaktivitäten wurden aus 10 d alten Zellen bestimmt. Angaben in Prozent der Kontrolle ohne GA_3

GA_3 (µM)	0	0,3	3	30
FG (%)	100	119	109	108
TG (%)	100	103	105	108
Protein (%)	100	105	111	105
Anthocyan (%)	100	78	73	75
Anthocyan-zunahme (%) (a	100	39	36	37
PAL (%)	100	59	40	45
CHS (%)	100	25	19	17
CHI (%)	100	83	61	71
G6PDH (%)	100	99	108	104

a) Zunahme vom 7. bis 12. Tag (auf TG bezogen)

aktivitäten wurden am 10. Tag also 3 d nach Zugabe von GA_3 bestimmt.

In Tabelle 8 sind die relativen Änderungen aller Parameter zusammengefaßt. Die Wachstums- und Anthocyanwerte wurden am 12. Tag, die Enzymaktivitäten am 10.Tag ermittelt. Im Gegensatz zur Wirkung über die gesamte Kulturperiode (vgl. Tab. 6) hatte GA_3 eher eine fördernde Wirkung auf das Wachstum. Die Anthocyangehalte der Zellen wurden nicht so stark reduziert, vergleicht man allerdings die Anthocyanzunahme vom 7. bis 12. Tag so wird die Hemmung deutlich.

Abbildung 18 zeigt den zeitlichen Verlauf der Anthocyanakkumulation und des Wachstums vom 7. bis 12. Tag. Wachstumsunterschiede unter GA_3 waren in den ersten beiden Tagen nach Gabe des Hormons festzustellen. Kurz nach Zugabe von GA_3 (30 min) besaßen die Zellen erhöhtes FG (Abb. 18a) und einen höheren Wassergehalt (Abb. 18c). Die Zellen hatten kurzfristig Wasser aufgenommen. Bei höheren GA_3-Konzentrationen erfolgte auch eine TG-Zunahme (Abb. 18b), dies könnte mit einer zusätzlichen Substanzaufnahme erklärt

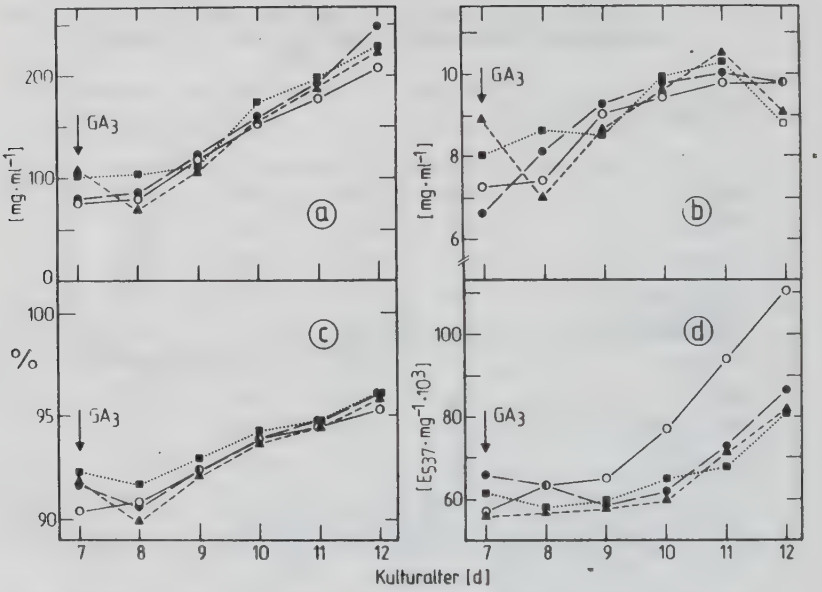


Abb. 18 Wirkung der verschiedenen GA_3-Konzentrationen auf Wachstum, Wasser- und Anthocyangehalte. GA_3-Gabe erfolgte zu 7 d alten Suspensionskulturen.
Kontrolle (○), 0,3 µM GA_3 (●), 3 µM GA_3 (■), 30 µM GA_3 (▲); a) FG, b) TG, c) Wassergehalt, d) Anthocyangehalt

werden (z.B. Ionen). Nach einem Tag sanken die erhöhten Werte wieder ab und glichen sich dann der Kontrolle an. Die Wirkung auf den Wasserhaushalt der Zellen war nur kurzfristig. Ab dem 9. Tag verlaufen alle Wachstumskurven ziemlich parallel.

Die Anthocyangehalte der Zellen (Abb. 18d) blieben unter GA_3-Wirkung bis zum 10. Tag etwa konstant um dann anzusteigen. Es fand also trotz reduzierter Enzymaktivitäten noch eine gewisse Synthese statt. Die Unterschiede unmittelbar nach Gabe von GA_3 kamen durch die Änderungen im TG zustande. Ein wesentlicher Unterschied zu den vorherigen Experimenten war, daß im Bereich von 0,3 - 30 µM GA_3 keine Dosisabhängigkeit mehr festgestellt werden konnte.

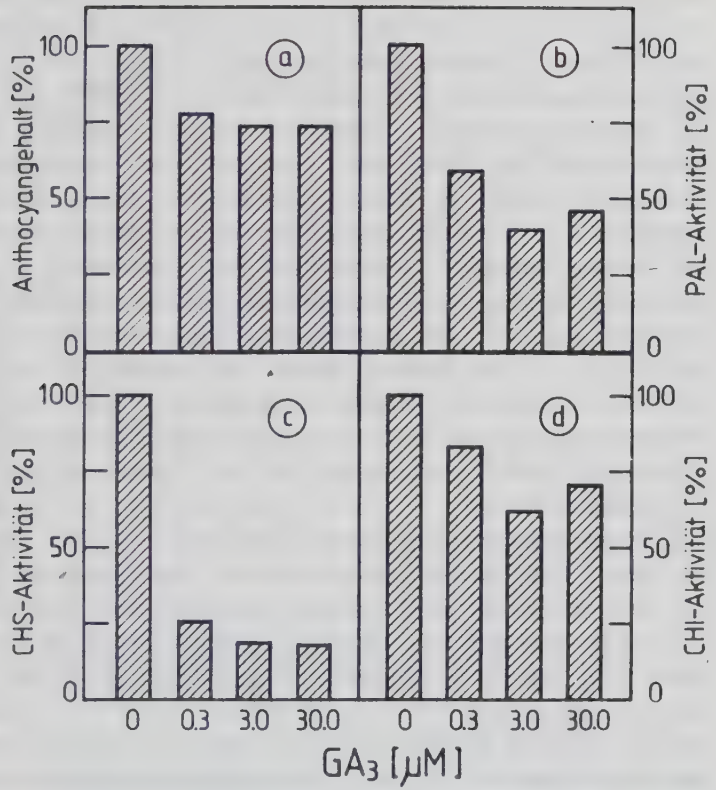


Abb. 19 Wirkung von GA_3 auf Anthocyangehalt und spezifische Aktivitäten von PAL, CHS und CHI. GA_3 wurde 7 d nach Start der Kulturen zugegeben.
a) Anthocyangehalt am 12. Tag, b) PAL am 10. Tag,
c) CHS am 10. Tag, d) CHI am 10. Tag
Angaben in Prozent der Kontrollen ohne GA_3

In Abbildung 19 wurden die Enzymaktivitäten (10. Tag) und die Anthocyangehalte (12. Tag) graphisch dargestellt. Der Effekt auf die CHS war sehr dramatisch (Abb. 19c). Die Hemmung betrug über 80 % und zeigte eine geringe Tendenz der ursprünglich festgestellten Dosisabhängigkeit. Die PAL wurde um 60 %, die CHI um 40 % und die G6PDH überhaupt nicht gehemmt (Abb. 19b und d, Tab. 8).

Die bevorzugte Wirkung von GA_3 auf die CHS wird besonders deutlich, wenn man die Werte von 0,3 µM GA_3 vergleicht, hier betrug die Hemmung der CHS bereits 75 %.
Aus den Ergebnissen läßt sich unschwer schließen, daß die CHS-Aktivität äußerst empfindlich auf GA_3 reagiert. Die Dosisabhängigkeit liegt bei dieser Art von Experimenten vermutlich unter 0,3 µM; Konzentrationen, die auch bei Kalluskulturen wirksam waren. Dies deutet darauf hin, daß die Zellen in der Differenzierungsphase besonders kompetent für GA_3 zu sein scheinen. Die geringe Empfindlichkeit gegenüber der GA_3-Gabe beim Überimpfen der Kultur in frisches Medium, könnte mit mangelnder Stabilität des Phytohormons in wässriger Lösung erklärt werden (Produktbeschreibung zu Auxillin ®, Merck, Darmstadt). Ebenso ist eine Inaktivierung von GA_3 (Abbau) in der Zelle möglich.
Ein Zusatzexperiment sollte zeigen, wie rasch die Abnahme der CHS unter GA_3-Einwirkung erfolgt. Die Kultur erhielt 7 d nach dem Animpfen 30 µM GA_3. Die Bestimmung der CHS-Aktivität erfolgte alle 24 h. Als zusätzlicher Vergleich wurde in einem Parallelversuch GA_3 bereits am 0. Tag zugesetzt.
Bereits nach 24 h wurde ein deutlicher Abfall der CHS-Aktivität registriert, während die Kontrolle anstieg, mit dem charakteristischen Maximum am 10. Tag (Abb. 20).
Es spielt offenbar keine große Rolle, ob GA_3 früher oder später gegeben wurde (bei dieser GA_3-Konzentration). Die beiden Kurven verlaufen sehr ähnlich. Die Kultur, die von Beginn an GA_3 erhielt, hatte am 10. Tag eine leichte Steigerung der CHS-Aktivität gezeigt. Der endogene GA_3-Spiegel scheint hier geringer zu sein als bei späterer Applikation.

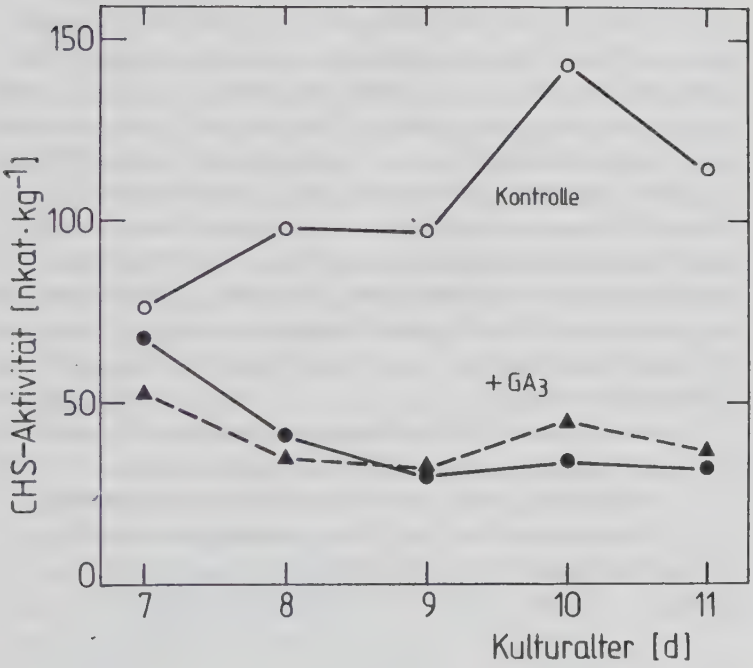


Abb. 20 Abnahme der CHS-Aktivität unter Einwirkung von 30 µM GA_3
Kontrolle ohne GA_3 (○), GA_3-Zugabe am 0. Tag (▲),
GA_3-Zugabe nach 7 d (●)

2.3. Wirkung von L-AOPP

L-AOPP ist ein Strukturanalogon zu L-Phenylalanin (Abb. 21) und ein sehr effektiver Inhibitor der PAL. Mit L-AOPP konnte in Suspensionskulturen die Anthocyansynthese gehemmt werden (NOÉ et al. 1980). Gleichzeitig wurde eine dramatische Steigerung der PAL-Aktivität ("Superinduktion") beobachtet, die durch de novo-Synthese erfolgte (NOÉ und SEITZ 1982 und 1983b). Die Wirkung von L-AOPP ist sehr spezifisch für die PAL. Weder die anderen Enzyme der Gruppe I (CAH, CCL), noch Wachstum und Proteinstoffwechsel werden beeinflußt (NOÉ und SEITZ 1982 und 1983a). Mit L-AOPP steht ein geeignetes Werkzeug zur Verfügung um auch die Regulation der CHS zu untersuchen. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- *Spielt das Substratangebot (Zimtsäure-CoA-Ester) bei der Regulation der CHS eine Rolle ?*
- *Wie verhält sich die CHS-Aktivität während der "Superinduktion" der PAL, erfolgt koordinierte Regulation ?*

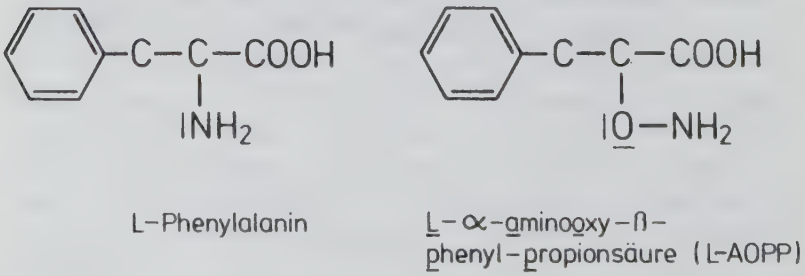


Abb. 21 Strukturformel von L-AOPP einem Analogon von L-Phenylalanin

Die Kulturen wurden in L-AOPP -haltigem Medium angeimpft. Die Endkonzentration des Inhibitors betrug 100 µM. Wachstum, Anthocyan und Enzymaktivitäten der PAL, CHS und CHI wurden kontinuierlich bis zum 12. Tag verfolgt. Abbildung 22 illustriert den Einfluß von L-AOPP auf Wachstum und Anthocyansynthese der Kultur. Die Wirkung von 100 µM L-AOPP auf das Wachstum war sehr gering. Im Vergleich zur Kontrolle war das Trockengewicht ab dem 10. Tag etwas verringert (Abb. 22a). Dies spiegelt sich auch in leicht erhöhten Werten für den Gehalt an löslichen Proteinen wieder (Abb. 22c). Die Kontrolle zeigte leider nicht den typischen Verlauf der Proteingehalte, mit dem sonst auftretenden Maximum am 4. Tag (vgl. Abb. 15b). Die hier verwendete Kultur war noch sehr jung (5. Passage) und vermutlich noch in der Adaptationsphase.
Auf die Anthocyansynthese wirkte L-AOPP wie erwartet. Die Anthocyangehalte der L-AOPP -behandelten Zellen nahmen ab, wahfend sie in der Kontrolle stark zugenommen hatten (Abb. 22b). Bestimmt man die gesamte Anthocyanmenge der Kultur (Anthocyanproduktion), so wird deutlich, daß auch unter Einwirkung von L-AOPP eine, allerdings sehr geringe, Zunahme erfolgte (Abb. 22d).
Der Verlauf der Enzymaktivitäten ist in Abbildung 23 dargestellt. Auf die PAL-Aktivität hatte L-AOPP nicht den erwarteten Effekt. Obwohl die PAL durch L-AOPP deutlich gesteigert wurde, besonders im Anschluß an den "Verdünnungseffekt" (12 h), zeigte sich doch keine "Superinduktion", die in früheren Untersuchungen durch eine starke Steigerung der PAL-Aktivität vom 2. auf den 4. Tag charakterisiert war (NOÉ et al. 1980, NOÉ und SEITZ 1982) (Abb. 23a). Dies könnte mit dem untypischen Proteinverlauf der Kultur zusammenhängen, die normalerweise ein Maximum des Proteingehalts nach 4 d durchläuft; mit diesem Maximum fällt die "Superinduktion" der PAL zusammen

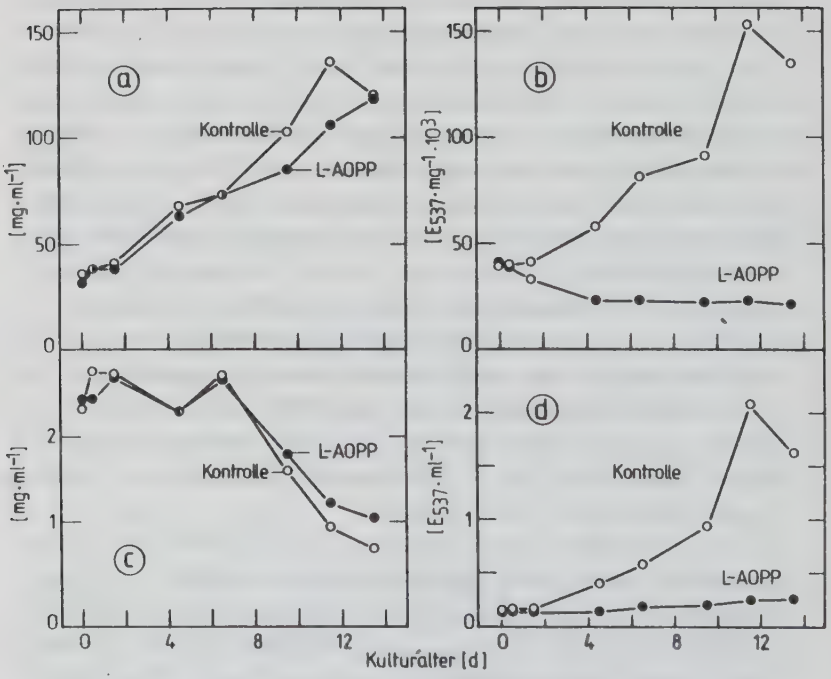


Abb. 22 Einfluß von L-AOPP (100 µM) auf a) Trockengewicht, c) Proteingehalt, b) Anthocyangehalt, d) Anthocyanproduktion einer Suspensionskultur

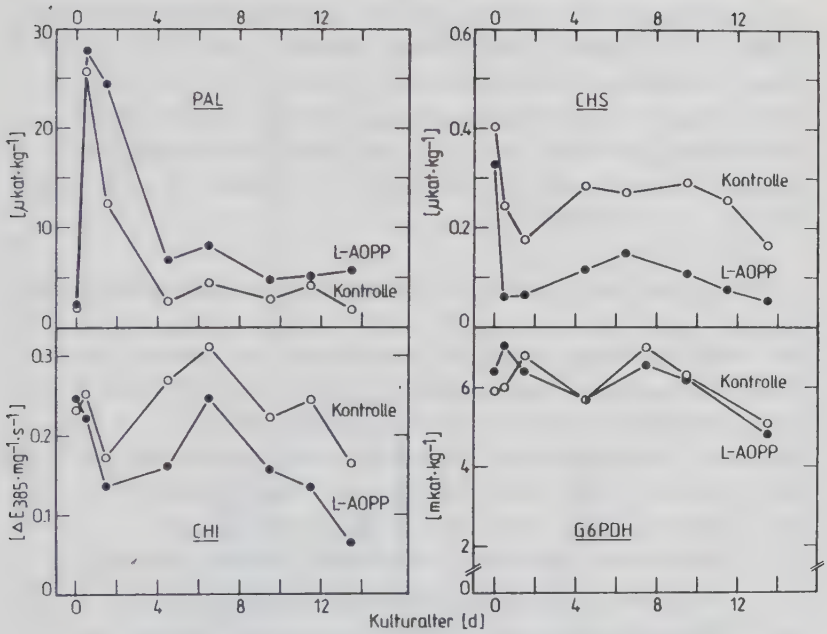


Abb. 23 Einfluß von 100 µM L-AOPP auf den Verlauf der spezifischen Enzymaktivitäten von PAL, CHS, CHI und G6PDH

NOÉ 1982) . Die CHS-Aktivität wurde im Beisein von L-AOPP stark gesenkt und zwar über die gesamte Kulturperiode. Die Abnahme erfolgte sehr rasch und beträgt nach 12 h nur 25 % der Kontrollaktivität (Abb. 23b). Ebenfalls vermindert wurde die CHI-Aktivität, allerdings nicht so stark und nicht so rasch (Abb. 23c). Die Aktivität der G6PDH wurde durch L-AOPP nicht beeinflußt (Abb. 23d). Ein Vergleich der CHS- und PAL-Aktivität bei der Kontrolle zeigt, daß auch im Falle der Induktion der PAL durch Verdünnung eine Abnahme der CHS-Aktivität stattfand. Allerdings geringer als unter L-AOPP. Die Abnahme der CHS-Aktivität scheint korreliert mit der PAL-Induktion.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß PAL und CHS getrennt reguliert werden. Mit GA_3 wurden beide Enzyme gehemmt, mit L-AOPP wurde die PAL induziert und die CHS gehemmt. Trotzdem ist eine koordinierte Regulation, die bei PAL-Induktion gegensinnig erfolgt, nicht auszuschließen, ebensowenig wie eine Substratregulation der Enzyme der Gruppe II. Auf diese Aspekte soll noch später eingegangen werden.

2.4. Einfluß von GA_3 und L-AOPP auf die freien Aminosäuren

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß L-AOPP-behandelte Suspensionszellen einen 2,3-fachen Gehalt an L-Phenylalanin (Phe) aufwiesen (NOÉ 1982).
Die hier durchgeführten Aminosäurenanalysen hatten das Ziel, die Wirkung von GA_3 systematisch zu untersuchen. Eine interessante Frage in diesem Zusammenhang war:

-Wirkt sich die Blockierung des Flavonoidstoffwechsels durch GA_3 auf den Gehalt an Phe aus ?

Durch Vergleich mit der Wirkung von L-AOPP sollten die beiden prinzipiell verschieden wirkenden Arten der Hemmung besser charakterisiert werden.

2.4.1. Wirkung von GA_3

Die Zugabe erfolgte zu 7 d alten Zellen, in verschiedenen Konzentrationen. Die Bestimmung der Aminosäuren wurde mit 10 d und 12 d alten Zellen durchgeführt.
Es wurden 14 Aminosäuren, zuzüglich GABA und NH_3 ausgewertet: Gln (319), Asn (223), Ala (222), NH_3 (49), Val (47), Ser (44), Thr (38), Asp (23), GABA (23), Glu (22), Phe (14), Ile (12), Gly (11), Leu (8), His (4). Die Werte in den Klammern sind aufgerundete Konzentrationen in nMol/mg TG.

Ebenfalls nachgewiesen, aber wegen zu großem statistischem Fehler (unregelmäßige Basislinie) nicht weiter ausgewertet, wurden Arg und α-Aminoadipinsäure.

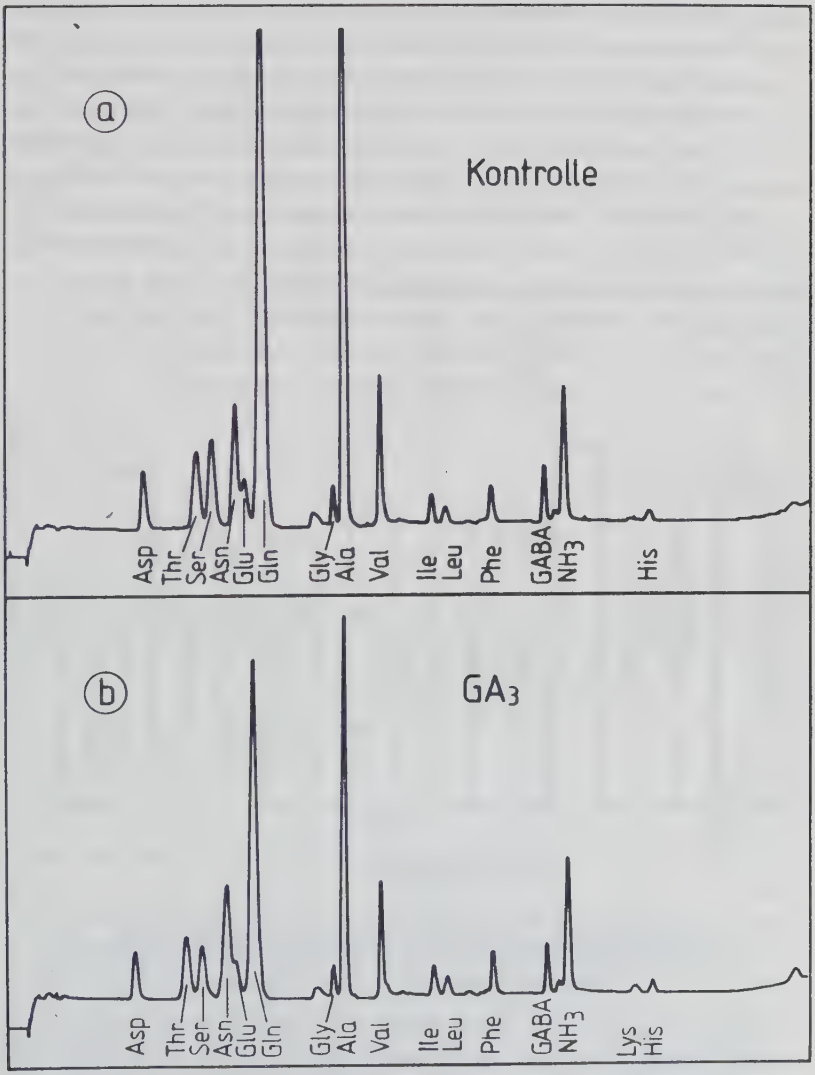


Abb. 24 Retensionsmuster der freien Aminosäuren aus 12 d alten Zellen
a) Kontrolle ohne GA_3 b) 30 µM GA_3 am 7. Tag zugegeben

Bei Analysen mit 10-fach konzentrierten (unverdünnten) Proben waren ferner nachweisbar: Tyr, Pro, Met, Cys, Trp, CysCys (alle < 1 nMol/mg).
Die Gesamtmenge der freien Aminosäuren nahm im Verlauf der zweiten Hälfte der Kulturperiode zu. Den Hauptanteil an der Zunahme (vom 10. bis 12. Tag) hatten dabei: Ala (+ 97 nMol/mg), Asn (+ 59 nMol/mg) und Serin (+ 13 nMol/mg). Einige Aminosäuren hatten auch abgenommen, vor allem Gln (- 50 nMol/mg), auch Phe wurde geringer (- 2 nMol/mg).
In Abbildung 24 sind die Retensionsmuster der Aminosäuren aus 12 d alten Zellen gezeigt. Es fällt auf, daß unter Wirkung von 30 µM GA_3 die Aminosäuren mehr oder weniger abnehmen. Die signifikanten, relativen Änderungen unter Einfluß von GA_3 sind in Abbildung 25 dargestellt.

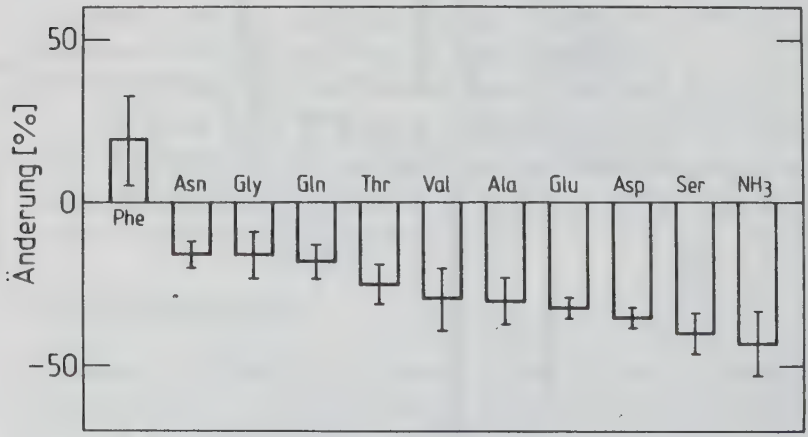


Abb. 25 Relative Änderungen der freien Aminosäuren unter Einfluß von 30 µM GA_3 vom 7. bis 12. Tag (mit Standardabweichungen)

Phe war die einzige Aminosäure, die zugenommen hatte. Die z.T. starke Abnahme der anderen Aminosäuren deutet darauf hin, daß GA_3 auch den Primärstoffwechsel beeinflußt. Das etwas erhöhte Phe könnte durch Rückstau (Feedbackregulationen) der Metaboliten des allgemeinen Phenylpropanstoff-

wechsels zustande kommen. Dabei könnte auch die reduzierte PAL-Aktivität (maximal 60 % Hemmung) beteiligt sein. Für die meisten Aminosäuren erfolgte die Abnahme dosisabhängig (z.B. Ser, Asp, Glu, Val und Thr), bei den anderen war die maximale Wirkung bei 3 µM (z.B. Gln, Ala, GABA). Abnahmen der Aminosäuregehalte gegenüber der Kontrolle waren in geringerem Maße auch schon 3 d nach GA_3-Gabe (10 d alte Zellen) festzustellen.
Für Phe wurden sämtliche ermittelten Werte graphisch dargestellt (Abb. 26).

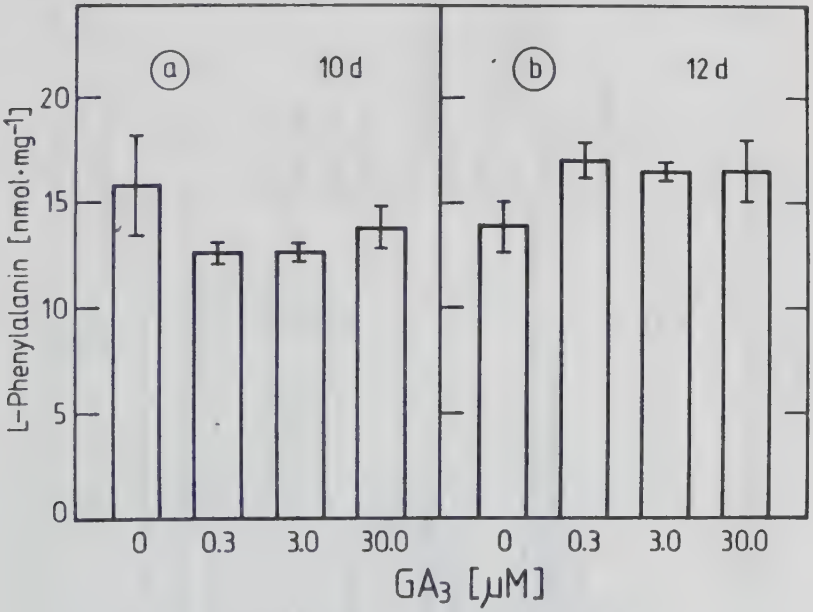


Abb. 26 Effekt von GA_3 auf den Gehalt an freiem L-Phenylalanin bei 10 d und 12 d alten Zellen. GA_3-Zugabe erfolgte 7 d nach dem Animpfen (mit Standardabweichungen)

Die Änderungen waren insgesamt sehr gering und teilweise statistisch nicht abgesichert. Nach 10 d wurde Phe unter GA_3 etwas geringer im Vergleich zur Kontrolle, während es nach 12 d höher als die Kontrolle war. Betrachtet man

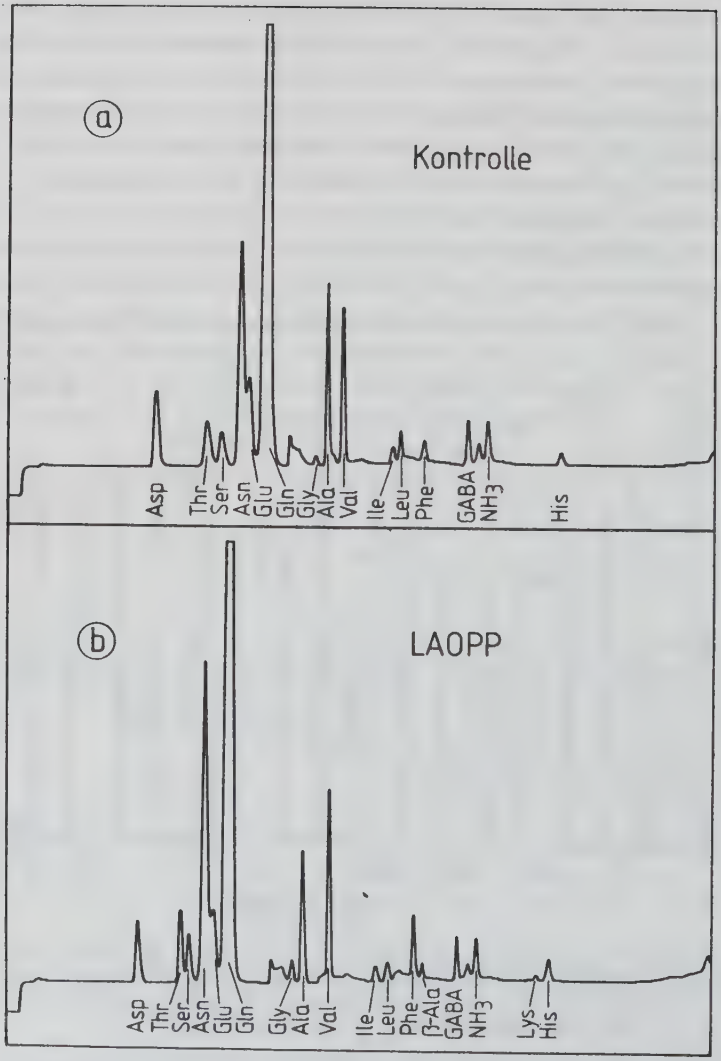


Abb. 27 Retensionsmuster der freien Aminosäuren aus 7 d alten Zellen.
a) Kontrolle ohne L-AOPP
b) 100 µM L-AOPP am 0. Tag zugegeben

allerdings die Änderung vom 10. zum 12. Tag, mit und ohne GA_3, ist eine klare Tendenz zu erkennen. Ohne GA_3 nimmt Phe ab, mit GA_3 zu. Die Differenzen besitzen allerdings nur geringe Signifikanz.

2.4.2. Wirkung von L-AOPP

Zugabe von 100 µM L-AOPP erfolgte am 0. Tag der Kultur. Nach 7 d und 12 d wurden die Zellen aufgearbeitet und die Aminosäuren bestimmt. Die kulturalterabhängige Änderung der Gehalte an freien Aminosäuren vom 7. bis 12. Tag war qualitativ gleich wie unter 2.4.1. beschrieben.

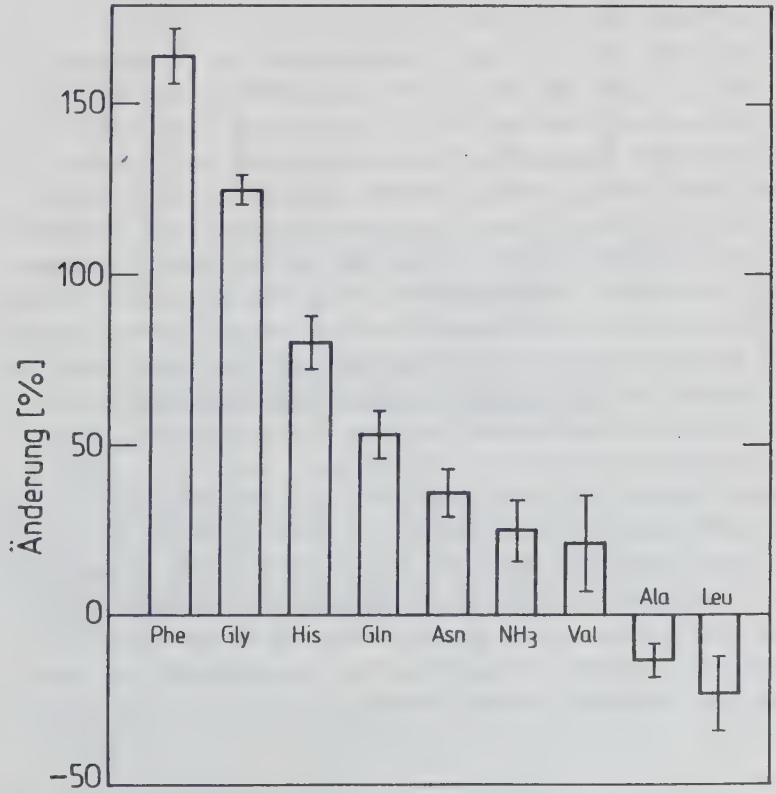


Abb. 28 Relative Änderung der freien Aminosäuren unter Einfluß von 100 µM L-AOPP vom 0. bis 7. Tag (mit Standardabweichungen)

Abbildung 27 zeigt die Retensionsmuster der Aminosäuren aus 7 d alten Zellen mit und ohne L-AOPP. Im Gegensatz zur GA_3-Wirkung erkennt man deutlich, daß viele Aminosäuren unter L-AOPP-Einwirkung zunehmen. Am besten ist dies für Phe zu sehen. L-AOPP selber war mit der angewandten Nachweismethode nicht erfaßbar.
Die signifikanten relativen Änderungen der Aminosäuren werden in Abbildung 28 gezeigt. Die Steigerung von Phe betrug 164 %. Auch andere Aminosäuren wurden im Vergleich zur Kontrolle durch L-AOPP erhöht. Die absoluten Änderungen waren besonders hoch für Gln (+ 244 nMol/mg) und Asn (+ 42 nMol/mg). Dagegen war die Zunahme von Phe (+ 11 nMol/mg) absolut gesehen gering, dies gilt auch für Abnahmen von Ala (- 8 nMol/mg) und Leu (- 3 nMol/mg).
In Abbildung 29 werden die absoluten Gehalte an Phe nach 7 d und 12 d mit und ohne L-AOPP verglichen. Nach 12 d war die Steigerung gegenüber der Kontrolle noch deutlicher (+ 201 %). Die Hemmung der Anthocyansynthese durch L-AOPP kommt durch Inaktivierung der PAL zustande, dadurch häuft sich freies Phe an. Andere Aminosäuren nehmen aber ebenfalls zu, vor allem die Amide Gln und Asn wurden, absolut gesehen, stark gesteigert. Möglicherweise sind dies sekundäre Effekte, die sich aus dem blockierten Phenylpropanstoffwechsel ergeben. Vielleicht werden die durch das fehlende Anthocyan (u. a. Phenole) frei werdenden Speicherkapazitäten der Vakuole für Stickstoffspeicherung (in Form von Aminosäuren) genutzt.
Die Aminosäurenanalyse der GA_3-Wirkung unterstützt vorhergehende Ergebnisse nach denen nicht die PAL- sondern die CHS-Reaktion den Engpaß der Anthocyansynthese darstellt. Phe hatte sich kaum geändert. Unter der Einwirkung von GA_3 vom 7. auf den 10. Tag, hatte Phe eher ab- als zugenommen, erst am 12. Tag war ein höherer Wert als in der Kontrolle vorhanden, vermutlich kommt dies durch den Abfall der PAL-Aktivität zustande. Dieser Abfall der PAL-Aktivität könnte

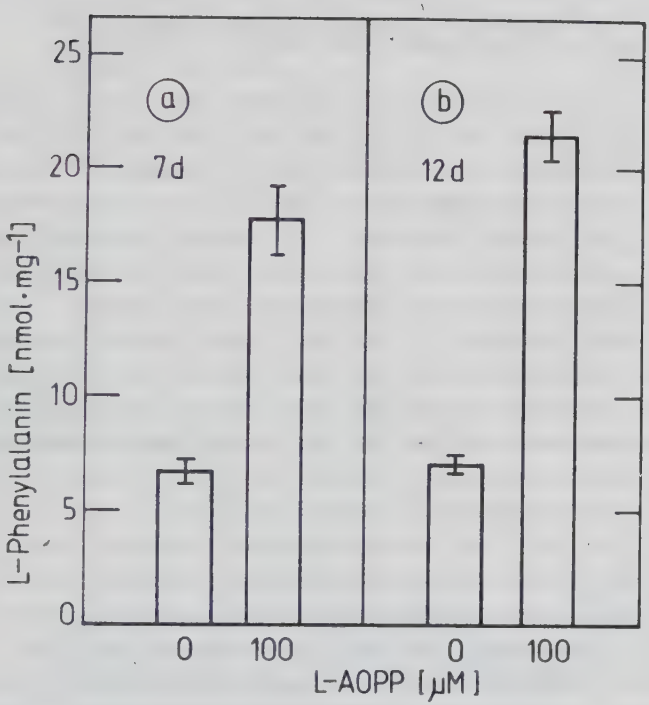


Abb. 29 Effekt von L-AOPP (100 µM) auf den Gehalt an freien L-Phenylalanin bei 7 d und 12 d alten Zellen. Zugabe von L-AOPP am 0. Tag (mit Standardabweichungen)

sekundär erfolgen durch eine Anhäufung von Chalconvorstufen (z.B. Zimtsäuren). Die z.T. dosisabhängige Abnahme vieler Aminosäuren unter GA_3 muß wohl mit einer zusätzlichen Wirkung von GA_3 auf Vorgänge des Primärstoffwechsels erklärt werden.

2.5. Störung des Ca^{2+}-Stoffwechsels der Zellen [1]

2.5.1. Versuche mit Lanthanchlorid

$LaCl_3$ wurde zu dem Zweck eingesetzt, den cytoplasmatischen Ca^{2+}-Spiegel zu verändern. Die Versuche sollten Hinweise für eine Beteiligung von Ca^{2+} bei der Regulation der Enzyme des Anthocyanstoffwechsels geben.
In vielen Fällen konnte La^{3+} die Wirkung von Ca^{2+} nicht nur ersetzen sondern auch verstärken, sodaß es als "Supercalcium" (TAKATA et al. 1966) bezeichnet wurde.
Es wurde festgestellt, daß La^{3+} nicht in die Pflanzenzelle eindringt, sondern als "extracellulärer Calciumantagonist" wirkt (SAUNDERS und HEPLER 1983) und Ca^{2+}-Bindungsstellen am Plasmalemma besetzt. Ob und in welcher Richtung La^{3+} die Calciumkonzentration im Cytoplasma beeinflußt, ist bei den folgenden Experimenten unbekannt.
Tabelle 9 zeigt die kurzfristige Wirkung von $LaCl_3$ (12 h) auf FG, Proteingehalte und Enzymaktivitäten 6 d alter Suspensionszellen. Vitalitätstests hatten gezeigt, daß die Zellen bei Inkubationen mit bis zu 100 µM $LaCl_3$ für 24 h vital bleiben (JANNASCH 1984). Das FG wurde leicht gesenkt, auf den Proteingehalt hatte $LaCl_3$ keinen Effekt. Die PAL- und CHS-Aktivität wurden stark gehemmt, während die CHI konstant blieb. Die G6PDH wurde gesteigert. Die Effekte waren bei 100 µM $LaCl_3$ stark, von der Tendenz her aber auch schon bei 10 µM $LaCl_3$ deutlich zu sehen.
Ganz andere Ergebnisse erhielt man, wenn $LaCl_3$ über die gesamte Kulturperiode einwirkte. Es wurden um eine Größenordnung geringere Konzentrationen verwendet als im vorherigen Versuch, um Effekte auf das Wachstum ausschließen zu können. Die Bestimmung der einzelnen Parameter erfolgte am 10.

1) Bei Herrn Dr. J. Gross (Tübingen) bedanke ich mich für Anregungen und Diskussionen im Zusammenhang mit dem Ca^{2+}-Aspekt und für sachdienliche Hinweise bei der Anwendung von $LaCl_3$ und A 23 187

Tab. 9 Kurzzeitwirkung (12 h) von $LaCl_3$ (10 µM/100 µM) auf Wachstum und Enzymaktivitäten einer anthocyanproduzierenden Suspensionskultur. Zugabe von $LaCl_3$ 6 d nach dem Überimpfen, Aufarbeitung der Zellen 12 h später. Werte angegeben in Prozent der Kontrolle ohne $LaCl_3$

	10 µM $LaCl_3$	100 µM $LaCl_3$
Frischgewicht (%)	95	93
Protein (%)	100	101
PAL (%)	71	33
CHS (%)	86	38
CHI (%)	94	106
G6PDH (%)	134	143

Tab. 10 Langzeitwirkung von $LaCl_3$ (1 µM/10 µM) auf Wachstum und Enzymaktivitäten einer anthocyanproduzierenden Suspensionskultur. Zugabe von $LaCl_3$ am Überimpftag, Aufarbeitung der Zellen 10 d später. Die Anthocyangehalte wurden 12 d später ermittelt. Angaben in Prozent der Kontrolle ohne $LaCl_3$

	1 µM $LaCl_3$	10 µM $LaCl_3$
Frischgewicht (%)	96	95
Trockengewicht (%)	104	103
Protein (%)	89	103
Anthocyan (%)	107	143
PAL (%)	132	88
CHS (%)	164	136
CHI (%)	89	91
G6PDH (%)	134	94

Tag (Tab. 10). Das FG war wiederum geringer als bei der Kontrolle. Die Enzymaktivitäten der PAL und CHS wurden durch 1 µM $LaCl_3$ deutlich gesteigert, während bei 10 µM nur die CHS erhöht war. Die CHI-Aktivität war wenig beeinflußbar. Die Anthocyangehalte der Zellen (am 12. Tag) wurden durch $LaCl_3$ erhöht, allerdings nicht direkt korreliert mit der Zunahme der CHS-Aktivität. Eine mögliche Phasenverschiebung (im Kulturalterverlauf) der Maxima von Enzymaktivitäten und Anthocyangehalt ist nicht auszuschließen.
Die Zellen reagieren sehr empfindlich auf $LaCl_3$, bereits mit 1 µM erzielte man starke Effekte. Die Wirksamkeit dieser Konzentration wurde in späteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bestätigt. Dabei wurde ebenfalls eine Steigerung der PAL festgestellt, sowohl bei Verdünnungseffekt nach 12 h, als auch beim relativen Maximum am 10. Tag; die Zellen besaßen in Gegenwart von $LaCl_3$ auch einen geringeren Wassergehalt (JANNASCH 1984).

2.5.2. Versuche mit Ca^{2+}-Ionophor A 23 187

Im Gegensatz zu den Versuchen mit $LaCl_3$ kann man bei der Manipulation der Ca^{2+}-Konzentration im Cytoplasma mit Hilfe von A 23187 nur von einer Erhöhung ausgehen. A 23 187 transportiert divalente Kationen durch Membranen, es agiert dabei als frei beweglicher carrier (REED und LARDY 1972). Die Anwendung von A 23 187 bereitete große Probleme. Die gewünschte Wirkung des Ionophors erfolgte nur in einem relativ schmalen Konzentrationsbereich, darüber hinaus war die Wirkung letal (> 0,1 µM). Die Wirkung hing zusätzlich von dem Verhältnis Zellmenge (Membranen) zu Ionophormenge ab. Auch die Inkubationszeit beeinflußte die Konzentrationsabhängigkeit. Langzeitexperimente mit dem Ionophor zeigten je nach Konzentration entweder keinen Effekt oder letale Wirkung (Wachstumshemmung). Erst kurzzeitige Inkubationen mit dem Ionophor führten zu besseren Resultaten.

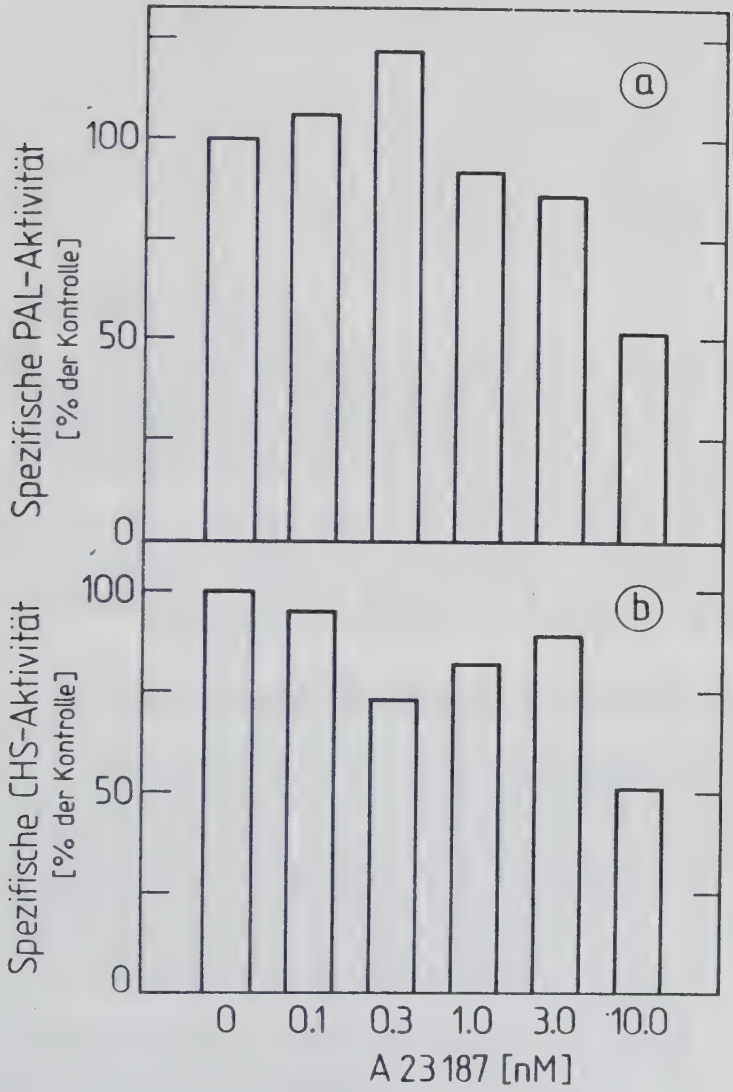


Abb. 30 Wirkung des Ca^{2+}-Ionophors A 23187 auf spezifische Enzymaktivitäten von PAL und CHS. Zugabe von A 23187 zu 9 d alten Suspensionszellen. Bestimmung der Enzymaktivitäten nach 24 h. Angaben in Prozent der Kontrolle ohne Ionophor

Abbildung 30 zeigt die Wirkung von A 23 187 nach 24 h Inkubation auf die Enzymaktivitäten von PAL und CHS am 10. Tag. Man erkennt, daß sich die beiden Aktivitäten entgegengesetzt verhalten. Bei 0,3 nM A 23 187 wurde die PAL-Aktivität um 23 % gesteigert, die CHS-Aktivität dagegen um 28 % gehemmt. Das Optimumsverhalten der PAL-Aktivität in Abhängigkeit von der A 23 187-Konzentration stimmt überein mit Ergebnissen von JANNASCH (1984).
Ein Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration im Cytoplasma bewirkt vermutlich eine Induktion der PAL unter gleichzeitiger Reduzierung der CHS-Aktivität. Dieses gegenläufige Verhalten der beiden Enzymaktivitäten trat auch unter L-AOPP auf. Eine solche Art der koordinierten Regulation wäre dann sinnvoll, wenn eine Umschaltung des Sekundärstoffwechsels von Anthocyansynthese auf die Synthese anderer Phenylpropane erfolgen soll.
Die Interpretation der Ergebnisse mit $LaCl_3$ ist schwierig. Eine deutliche Wirksamkeit auf die Enzyme wurde zwar gezeigt, aber die Primärwirkung von La^{3+} sowie die Spezifität in Bezug auf Ca^{2+}-Prozesse ist unbekannt.

2.6. Versuche zur Steigerung der Anthocyanproduktion

Die nachlassende Fähigkeit zur Anthocyansynthese bei Suspensionskulturen von *Daucus carota* war eine unerwünschte Eigenschaft. Das ständige Etablieren neuer Kulturen, mit schlecht kontrollierbaren Adaptationsphasen, erforderte einen großen Zeitaufwand und langfristige Versuchsplanungen. Es wäre ein großer Vorteil, wenn man die Anthocyanproduktion auf dem hohen Anfangsniveau der Kultur stabilisieren könnte.
Das Nachlassen der Anthocyansynthese ging Hand in Hand mit reduzierten Enzymaktivitäten, vor allem der CHS, und gesteigertem Wachstum. Auf dieses Phänomen wurde bereits eingegangen (I.3.). Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen kamen zu dem Resultat, daß die Anthocyanproduktion wesent-

lich von der Zusammensetzung des Mediums abhängt (DOUGALL et al. 1980, 1983a und b, KNOBLOCH et al. 1982, YAMAKAWA et al. 1983). Dabei konnte vor allem durch Reduzieren des Phosphats und Nitrats im Nährmedium die Anthocyansynthese gesteigert werden. Die folgenden Versuche sollen zeigen, ob durch Phosphat- bzw. Nitrat-limitiertes Wachstum die Kulturen veranlaßt werden, mehr Anthocyan zu produzieren. Die verwendeten Medien sind in II.10.6. beschrieben.

2.6.1. Phosphatmangel

Wachstum und Anthocyanproduktion einer Suspensionskultur, in Nährmedien mit unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen, wurden über die gesamte Kulturperiode verfolgt. Das Standardmedium der Kontrolle enthielt 1,25 mM Phosphat. Ein um 2/3 im Phosphatgehalt reduziertes Medium enthielt 0,42 mM Phosphat. Außerdem wurde noch phosphatfreies Medium verwendet. Nicht berücksichtigt ist diejenige Phosphatmenge, die durch das Inoculum bei Animpfen hinzukommt.
Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt. Durch Reduzieren der Phosphatmenge um 2/3 wurde die FG-Zunahme stark erniedrigt. Die TG-Zunahme war in geringem Maße beeinflußt, was auf einen geringeren Wassergehalt der Zellen schließen läßt. Im phosphatfreien Medium war das Wachstum ab dem 4. Tag total gehemmt (Abb. 31a und b). Die Anthocyansynthese zeigt ein gegenteiliges Verhalten. Bis zum 7. Tag waren die Anthocyangehalte der Zellen umgekehrt proportional zur Phosphatkonzentration. Die höchsten Anthocyangehalte wurden in phosphatarmem Nährmedium erzielt. Die Steigerung gegenüber der Kontrolle betrug im Maximum 62 % (Abb. 31c). Die Werte für die Anthocyanproduktion (Anthocyanmenge pro ml Zellsuspension) verhalten sich ähnlich (Abb. 31d).

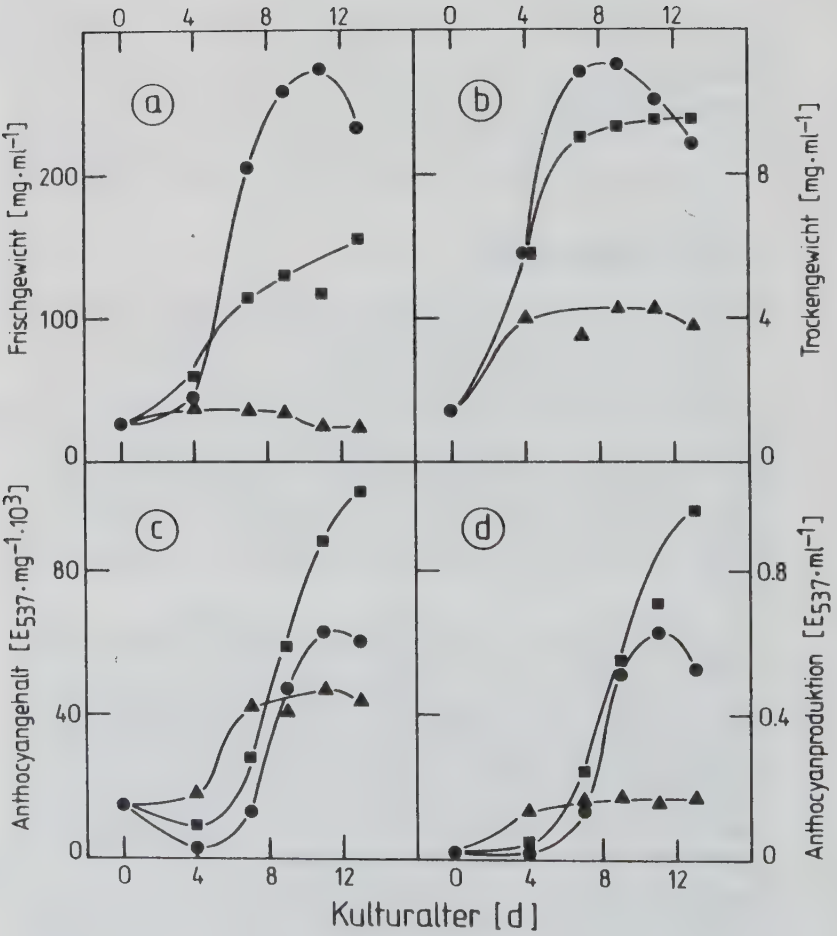


Abb. 31 Wirkung von Phosphatmangel im Nährmedium auf a) Frischgewicht, b) Trockengewicht, c) Anthocyangehalt, d) Anthocyanproduktion
Kontrolle: I2a Medium (●), Phosphatreduziert (2/3) (■), Phosphatfrei (▲)
Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien siehe II.10.6.

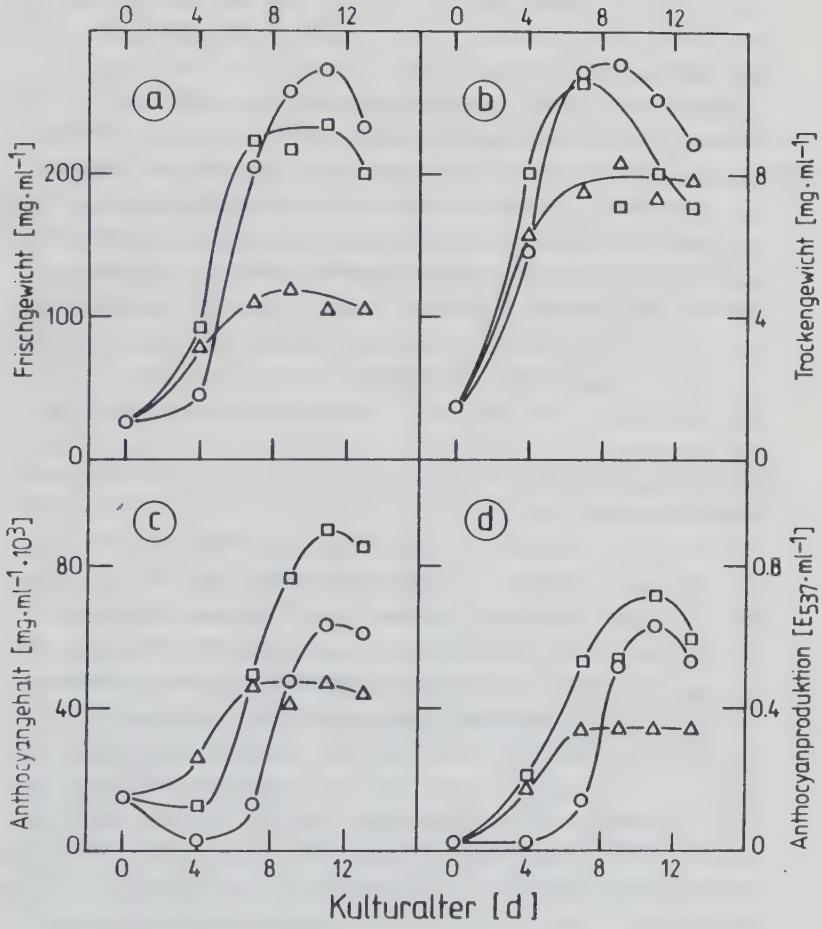


Abb. 32 Wirkung von Nitratmangel im Nährmedium auf a) Frischgewicht, b) Trockengewicht, c) Anthocyangehalt, d) Anthocyanproduktion
Kontrolle: I2a Medium (○), Nitratreduziert (2/3) (□), Nitratfrei (△)
Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien siehe II.10.6.

2.6.2. Nitratmangel

Entsprechende Versuche (zu 2.6.1.) wurden mit nitratarmen Nährmedien durchgeführt (Abb. 32).
Das Nährmedium der Kontrolle enthielt 39,4 mM, das reduzierte Medium 13,1 mM Gesamtnitrat. Auch hier wurde zusätzlich nitratfreies Medium verwendet. Durch die Verringerung der Nitratmenge auf 1/3 wurden FG und TG nur gering beeinflußt. Selbst in Medium ganz ohne Nitrat (bis auf das Nitrat im Inoculum) fand noch deutliches Wachstum statt. Das TG war beispielsweise nur um 30 % reduziert. Das Medium enthielt offenbar noch genügend N-haltige Verbindungen (Aminosäuren, Ammonium und Nitrat des Inoculums). Die Anthocyangehalte verhielten sich ähnlich wie unter Phosphatmangel. Die höchsten Anthocyanwerte wurden mit nitratreduziertem Medium erzielt (Abb. 32c und d). Die Anthocyangehalte der Zellen konnten um 43 % (im Maximum) erhöht werden.
Wird das Wachstum der Suspensionskultur durch Phosphat bzw. Nitrat limitiert, setzt die Anthocyansynthese früher ein und hält dementsprechend länger an. Die Differenzierungsphase der Kultur, die Umstellung von Primärstoffwechsel (Wachstum) auf Sekundärstoffwechsel (Anthocyan) wurde auf einen früheren Zeitpunkt hin verschoben.
Die Verringerung von Phosphat und Nitrat erscheint ein geeignetes Mittel zu sein, das Wachstum der Kulturen auf ein bestimmtes Niveau herabzusetzen und damit die Anthocyansynthese zu steigern. Es müßte noch untersucht werden, ob solche, im Wachstum "gebremsten" Kulturen, eine bessere Stabilität in Bezug auf Anthocyanproduktion aufweisen.
Das I2a Medium wurde für Wachstum von Kalluskulturen optimiert und enthält hohe Phosphat- und Nitratgehalte, die einen hemmenden Einfluß auf die Anthocyanakkumulation ausüben. Besonders Nitrat ist, auch bezüglich Wachstum, in einer unnötig hohen Konzentration enthalten.

3. In vitro-Versuche I: Teilweise Reinigung und Charakterisierung der CHS aus Suspensionskulturen

3.1. Reinigung der CHS

Die CHS in Rohextrakten hatte einige ungünstige Eigenschaften: Geringe Aktivität, sehr geringe Stabilität, nicht ideale Protein- und Zeitabhängigkeit im Test. Das Ziel der Reinigung war eine sehr aktive, stabile CHS-Präparation herzustellen, die als konstante CHS-Quelle in Mischexperimenten eingesetzt werden kann. Sowohl die Natur des "Inhibitors" als auch die Eigenschaften der CHS in vitro sollten damit untersucht werden.

3.1.1. Stabilität der CHS

Die CHS aus *Daucus carota* war extrem instabil, eine Eigenschaft der CHS, über die vielfach berichtet wurde (KREUZALER und HAHLBROCK 1975b, SALEH et al. 1978, SÜTFELD et al. 1978, WHITEHEAD und DIXON 1983).
In mit Dowex behandelten Rohextrakten nahm die Aktivität bei 0-5 °C innerhalb von 3 h um 50 % ab. Bei höheren Temperaturen erfolgte die Abnahme noch rascher (Abb. 33a).
Die Enzymextrakte der in vivo-Experimente wurden deshalb sofort nach Aufarbeitung eingefroren und erst unmittelbar vor dem Test aufgetaut.
Erhöhung der ME-Konzentration von 1,4 mM auf 14 mM führte zu höheren Anfangsaktivitäten und verbesserter Stabilität (Abb. 33b), hatte aber den unerwünschten Effekt gesteigerter Nebenprodukte im Test. Mit 1 mM DTT war die Stabilität ähnlich gering wie mit 1,4 mM ME (Abb. 33d). Ganz ohne ME war die Anfangsaktivität zwar geringer, dafür war die Stabilität aber deutlich verbessert (Abb. 33b). Bei der Reinigung der CHS wurde deshalb auf ME verzichtet. Von dem Schritt der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung an, enthielten die Puffer kein ME. Dies führte zu höheren Anreicherungen und Ausbeuten im Vergleich zu Aufarbeitungen

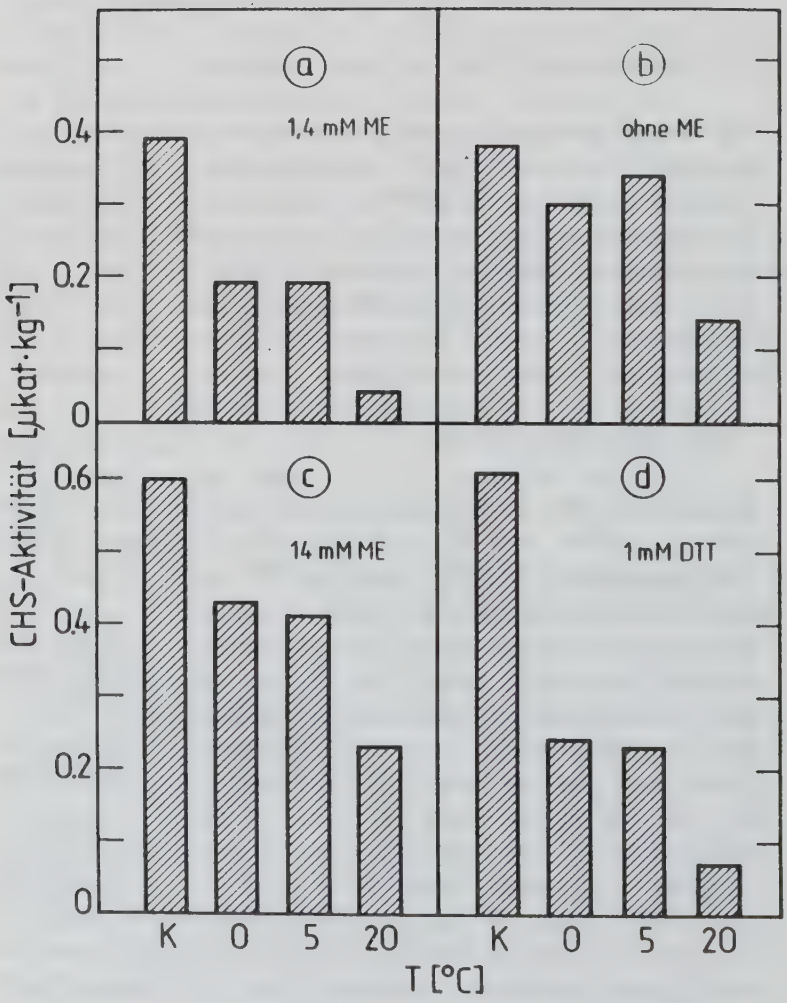


Abb. 33 Stabilität der CHS in Dowex-behandelten Rohextrakten, aufgearbeitet in KPi-Puffer (100 mM; pH 8,0) mit verschiedenen Zusätzen
a) + 1,4 mM ME, b) ohne ME, c) + 14 mM ME, d) + 1 mM DTT
K = Kontrolle, sofort eingefroren
Übrige Extrakte wurden bei verschiedenen Temperaturen für 3 h inkubiert und dann eingefroren

mit permanenter Verwendung von ME.
Es sollte noch erwähnt werden, daß die CHS-Aktivität in Tris-Puffer erheblich geringer war als in Phosphatpuffer, das galt sowohl für die Verwendung von Tris bei der Aufarbeitung als auch als Testpuffer. Dies wurde auch für die Petersilie-CHS berichtet (KREUZALER und HAHLBROCK 1975b). Es ist nicht ratsam, Tris in Kombination mit ME zu verwenden, da Tris die Oxidation von ME und von SH-Gruppen der Proteine fördert (KOUNDAL et al. 1983).
Ein weiterer wichtiger Aspekt für Stabilisierung und Lagerung der CHS ist die Proteinkonzentration der Proben. In Präparationen mit weniger als 1 mg Protein pro ml ergaben sich große Verluste beim Einfrieren (oder Auftauen). Dazu kam eine stetige Abnahme der Aktivität während der Lagerung, selbst bei -70 °C (50 % Abnahme nach ca. 8 Wochen). Dagegen waren Proben mit 3-4 mg Protein pro ml sehr stabil und konnten mehrere Monate ohne große Aktivitätsverluste (bei -70 °C) gelagert werden. Diese Eigenschaft besaß auch die CHS aus Petersilie (SCHRÖDER et al. 1979a).

3.1.2. Vorversuche mit DEAE-Sephacel

Die Vorversuche hatten den Zweck die optimalen Trennbedingungen für die CHS auf der DEAE-Sephacel-Säule zu ermitteln. Der isoelektrische Punkt (pI) der CHS wurde näherungsweise bestimmt. Ebenso wurde die NaCl-Konzentration ermittelt, bei der sich das Enzym von DEAE-Sephacel ablöst.
Der Versuch zur Abschätzung des pI ist in Abbildung 34 dargestellt. Getestet wurde im pH-Bereich von 5-7,5. Als Puffer wurde KPi (10 mM) verwendet, welches zwischen pH 5 und 6 geringere Pufferkapazität besitzt. Dieser Bereich wurde zusätzlich mit MES-Acetatpuffer (10 mM) abgesichert. Bis pH 6,5 blieb die CHS an DEAE-Sephacel gebunden, lag also in der anionischen Form vor. Von pH 6 bis pH 5 löste sich immer mehr CHS-Aktivität ab. In diesem Bereich liegt der pI. Bei pH 5,3 befand sich etwa 50 % der

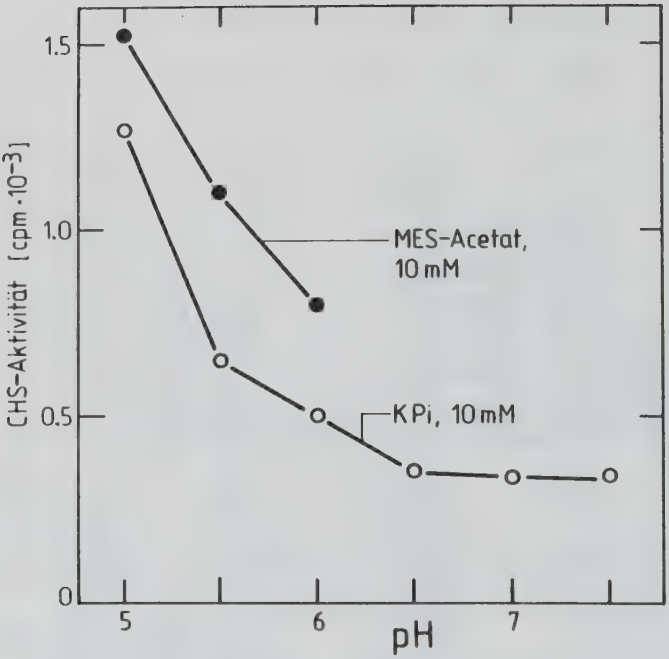


Abb. 34 Näherungsweise Bestimmung des isoelektrischen Punkts der CHS mit DEAE-Sephacel. Messung der nicht gebundenen CHS-Aktivität aus dem Überstand

Aktivität im Überstand.

Die Bindung der CHS an den Ionenaustauscher war relativ schwach. Schon bei geringen Ionenstärken (50 mM NaCl) löste sie sich ab. Bei 150 mM NaCl war die gesamte Aktivität im Überstand (Abb. 35).

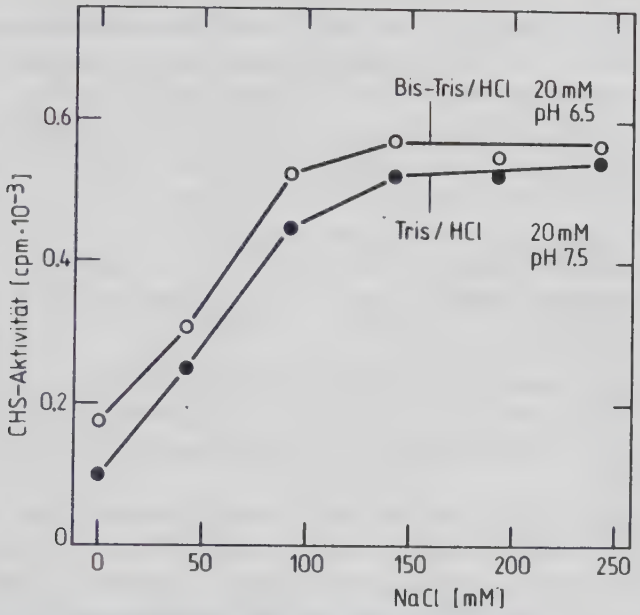


Abb. 35 Bindung von CHS an DEAE-Sephacel in Abhängigkeit der Ionenstärke (NaCl). Messung der nicht gebundenen CHS-Aktivität im Überstand

3.1.3. Die Reinigungsprozedur

Die Reinigung der CHS gliederte sich in folgende Schritte:

1. Rohextrakt
2. Dowex-Überstand
3. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (50-80%)
4. Sephadex G-25
5. DEAE-Sephacel
6. Ultrafiltration

Als Konsequenz der in den Vorversuchen über die Stabilität der CHS gewonnenen Erkenntnisse, wurde ME vom 3. Schritt an nicht mehr zugesetzt. Außerdem wurde der pH-Wert schrittweise von pH 8 bis pH 6,5 gesenkt (siehe II.8.1.-8.4.).

Tab. 11 Partielle Reinigung der CHS

Reinigungsschritt	Protein (mg)	spezifische Aktivität (µkat/kg)	Reinigung (- fach)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	706	0,060	1,0	100
Dowex-Überstand	644	0,101	1,7	154
Amm.Sulfat Frakt. 50 - 80 % Sephadex G-25	94	0,424	7,1	94
DEAE-Sephacel Ultrafiltration	14	2,071	34,5	68

Damit erreichte man eine bessere Trennung bei der Ionenaustauscherchromatographie. Der Pufferwechsel von Phosphat auf Bis-Tris/HCl erfolgte auf der Sephadex G-25-Säule. Dieser Schritt ist zugleich eine Entsalzung. Bis-Tris-Puffer erwies sich als sehr geeignet für Trennung und Stabilisierung der CHS.

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse der einzelnen Reinigungsschritte zusammengestellt, ausgehend von 200 g Suspensionszellen. Die gesamte Prozedur wurde ohne Unterbrechung innerhalb von 24 h durchgeführt. Die CHS wurde 34,5 fach gereinigt, mit einer Ausbeute von 68 %.

Es muß angemerkt werden, daß die Dowex-Behandlung keinen eigentlichen Reinigungsschritt darstellt. Obwohl dabei auch etwas Protein entfernt wurde, führte die Beseitigung störender phenolischer Verbindungen durch das Ionenaustauscherharz zu einer Aktivitätssteigerung. Bezieht man die Reinigung auf die Werte des Dowex-Überstandes, war sie nur noch 20,3 fach, mit einer Ausbeute von 44 %.

Die Kalkulation der Reinigungsfaktoren erfolgte auf der Basis der Naringeninwerte. Die angewandten Reinigungsprozeduren hatten keinen Einfluß auf die Qualität der CHS-

Reaktion (Ausbeute an Naringenin); es trat keine verstärkte Bildung von Nebenprodukten im Test auf, wie dies für die CHS aus Petersilie berichtet wurde (KREUZALER und HAHLBROCK 1975a).

Bei der Trennung auf der DEAE-Sephacel-Säule verteilte sich die CHS-Aktivität relativ breit (Abb. 36). Die CHS wurde etwa bei 70 mM NaCl eluiert. Die Fraktionen wurden auch auf Hemmaktivität in CHS-Mischexperimenten getestet, um eventuell den "Inhibitor" auch in Zellen mit aktiver CHS nachzuweisen. Es zeigte sich jedoch keinerlei signifikante Hemmung.

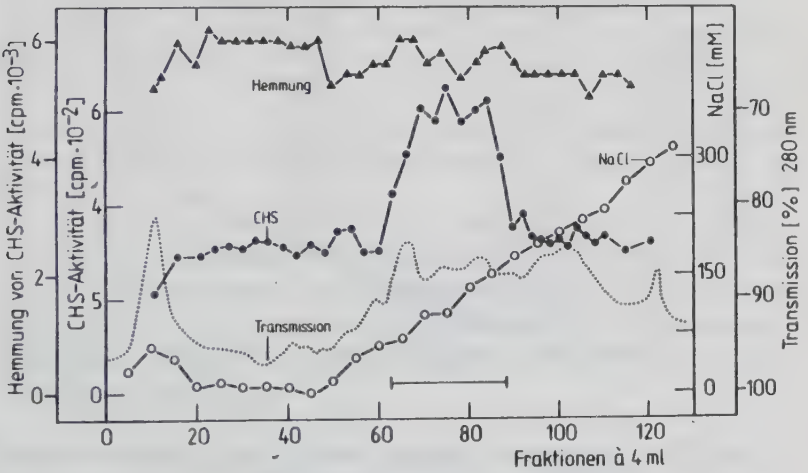


Abb. 36 Elutionsprofil der CHS-Aktivität auf der DEAE-Sephacel-Säule

●——● CHS-Aktivität
▲——▲ Hemmaktivität in Mischexperimenten
o——o NaCl
····· Transmission 280 nm
⊢—⊣ vereinigte Fraktionen

3.1.4. FPLC

Als Alternative zur DEAE-Säule wurden Trennungen auf der Mono Q-Säule des FPLC-Systems (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

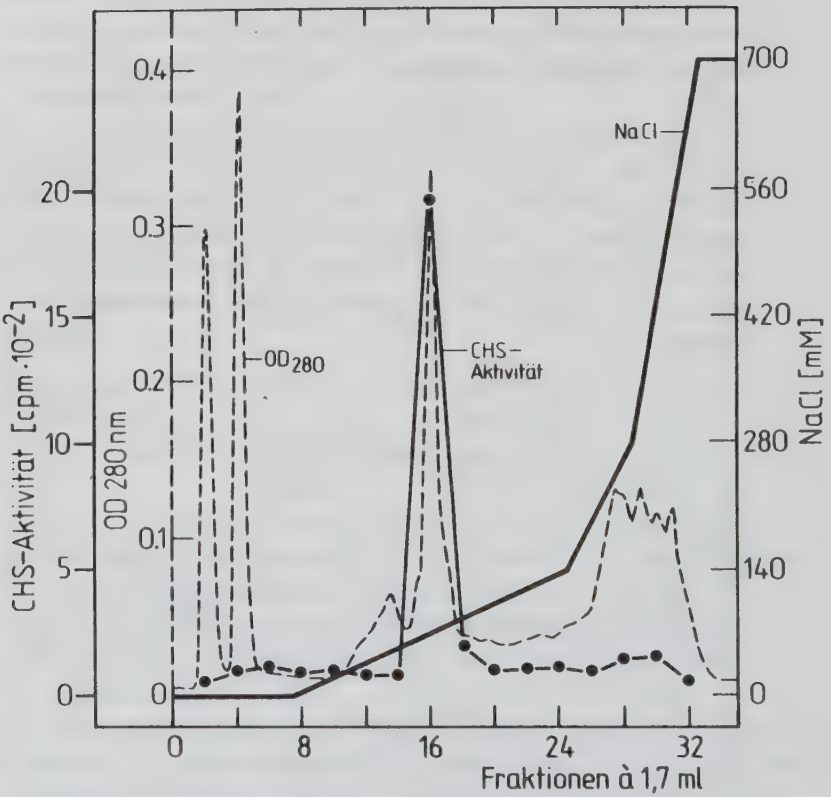


Abb. 37 Elutionsprofil der CHS-Aktivität auf der Mono Q-Säule (FPLC-System)

● —— ● CHS-Aktivität
—— NaCl
····· OD 280 nm

durchgeführt. Dabei waren die einzelnen Schritte des Reinigunsprozesses etwas geändert:

1. Rohextrakt
2. Dowex-Überstand
3. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (50 - 80 %)
4. Sephadex G-25
5. Ultrafiltration, Lagerung bei -20 °C (mehrere Tage)
6. Mono Q (nur mit Teilmenge aus 5.)
7. Ultrafiltration

Das Elutionsprofil der Trennung auf der Mono Q-Säule zeigt Abbildung 37. Der gesamte Lauf dauerte nur 20 min. Die CHS wurde etwa bei 60 mM NaCl eluiert und war nur auf wenige ml verteilt. Die auf diese Weise gereinigte CHS-Präparation verlor die gesamte Aktivität nach dem Einfrieren, vermutlich aufgrund zu geringer Proteinkonzentration (siehe 3.1.1.), daher konnten keine Reinigungsfaktoren und Ausbeuten angegeben werden.

3.2. Charakterisierung der CHS

Die gesamte Charakterisierung wurde mit einer einzigen Präparation durchgeführt, die auf die in 3.1.3. beschriebene Weise hergestellt wurde.

3.2.1. Eigenschaften des Standardtests, Vergleich der beiden Methoden zur CHS-Bestimmung

Wie bereits bei der Charakterisierung der CHS aus Blüten erwähnt (1.3.), wurden bei der Bestimmung von CHS-Aktivitäten immer die gesamten Ethylacetat-löslichen radioaktiven Produkte analysiert und der Flavanongehalt davon bestimmt. Die Eigenschaften der partiell gereinigten CHS im Standardtest zeigt Tabelle 12.

Tab. 12 Produktbildung partiell gereinigter CHS im Standardtest unter verschiedenen Bedingungen

Testbedingung	Radioaktivität total (cpm)	Naringenin (cpm)
Komplett	8263	6693
Extrakt gekocht	275	0
- 4-Cumaroyl-CoA	835	0
- ME	4538	4511
- BSA	5460	4505
- ME / - BSA	3420	2984

Die Unterschiede der beiden Methoden kommen durch Nebenprodukte der CHS-Reaktion zustande. Der Anteil an Nebenprodukten betrug unter Standardbedingungen unter 20 %. Mit gekochtem Enzymextrakt oder ohne 4-Cumaroyl-CoA konnte kein Naringenin bestimmt werden. Ein gewisser Anteil von Nicht-Flavanon-Produkten wurde auch in Abwesenheit von 4-Cumaroyl-CoA gebildet. Ohne BSA oder ohne ME nahm die Naringeninmenge jeweils um 33 % ab. Dabei handelte es sich um unterschiedliche Wirkungen, denn wenn beides weggelassen wurde, sanken die Naringeninwerte wieder um 33 % ab. Die Reaktionsprodukte im Testansatz mit BSA und ohne ME waren zu 100 % Naringenin, keinerlei Nebenprodukte waren nachweisbar. BSA stabilisiert vermutlich die CHS im Test. Die Aktivitäten der CHS in Rohextrakten aus Blüten hingen zu 100 % von BSA ab (vergleiche Tab. 5). In Gegenwart von ME (1,4 mM) war der Naringenin-Anteil knapp über 80 % und war unbeeinflußt von BSA.

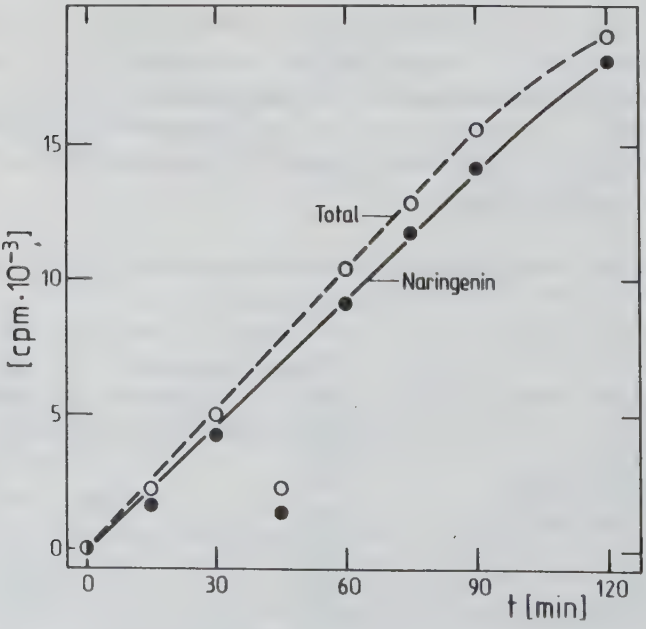


Abb. 38 Reaktionskinetik mit der partiell gereinigten CHS-Präparation (70 µg Protein)

Die CHS-Aktivität wurde durch ME und BSA gesteigert, beide Effekte waren synergistisch. Im Gegensatz zu BSA fördert ME die Bildung von Nebenprodukten. BSA hatte auf diese Wirkung von ME keinen Einfluß.

3.2.2. Reaktionskinetik und Proteinabhängigkeit

Bei einer CHS-Aktivität von 0,05 pkat im Test war die Reaktion für mindestens 2 h linear, dabei wurde über den gesamten Zeitraum fast nur Naringenin gebildet (Abb. 38). Die Proteinabhängigkeit zeigte ebenfalls eine hohe Linearität bis 210 µg, bei 30 min Testzeit. Bei höheren Proteinkonzentrationen erhöhte sich der Anteil der Nebenprodukte (Abbildung 39).

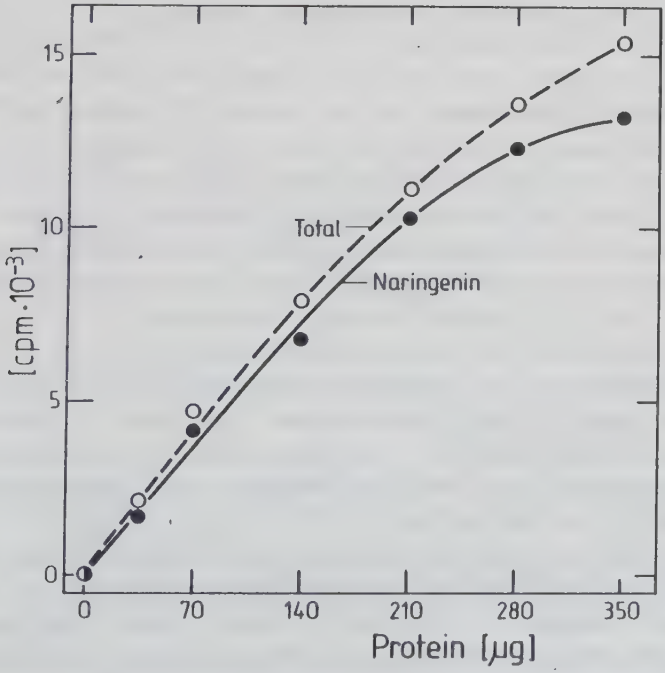


Abb. 39 Proteinabhängigkeit im CHS-Standardtest bei konstanter Reaktionszeit (t=30 min)

Maximal konnte 30 % der angebotenen Radioaktivität (Malonyl-CoA) in Naringenin eingebaut werden, dies entspricht etwa 0,2 nMol Naringenin. Die partiell gereinigte CHS wäre demnach gut geeignet für die präparative Synthese von ^{14}C-Naringenin.

3.2.3. Einfluß von 2-Mercaptoethanol und BSA

Die Wirkung steigender ME-Konzentrationen auf die Produktbildung der CHS, mit und ohne BSA, wurde untersucht. Ein deutliches Maximum der Produktbildung wurde bei 0,7 mM ME festgestellt (Abbildung 40a). Zwischen 0,7 und 3,5 mM nahm die Naringenin-Bildung ab, während die gesamte Radioaktivität nahezu konstant blieb (ohne BSA) bzw. weiter zunahm (mit BSA) auf Grund gesteigerter Bildung von Nebenprodukten. Bei Konzentrationen über 3,5 mM wurde die CHS-Aktivität stark gehemmt. BSA erhöhte die Aktivität über den gesamten Konzentrationsbereich von ME, hatte aber keinen Einfluß auf die Wirkung von ME (Freisetzung von Nebenprodukten). In der in Abbildung 40b gewählten Darstellung wird dieser Sachverhalt noch deutlicher. Unter der Einwirkung steigender ME-Konzentrationen nahm das Verhältnis Naringenin : gesamte Radioaktivität stark ab. BSA hatte nur einen geringen Einfluß auf die relative Naringenin-Ausbeute.
Die Förderung der Nebenproduktbildung zeigt auch Abbildung 41. Während unter Standardbedingungen (1,4 mM ME) nur Naringenin im Radiochromatogramm lokalisiert werden konnte (Abb. 41a), waren bei 7 mM ME im Test zwei Nebenprodukte nachweisbar (Abb. 41b). Der Naringenin-Anteil unter diesen Bedingungen betrug nur 33 %.
Die Nebenprodukte wurden nicht identifiziert, hatten aber übereinstimmendes chromatographisches Verhalten mit den Nebenprodukten der CHS aus *Matthiola incana* (SPRIBILLE und FORKMANN 1981). Dieselben Nebenprodukte traten auch unter Einwirkung von DTT (an Stelle von ME) auf.
Über ähnliche Abhängigkeiten der CHS von SH-Gruppen wurde mehrmals berichtet (KREUZALER und HAHLBROCK 1975a,

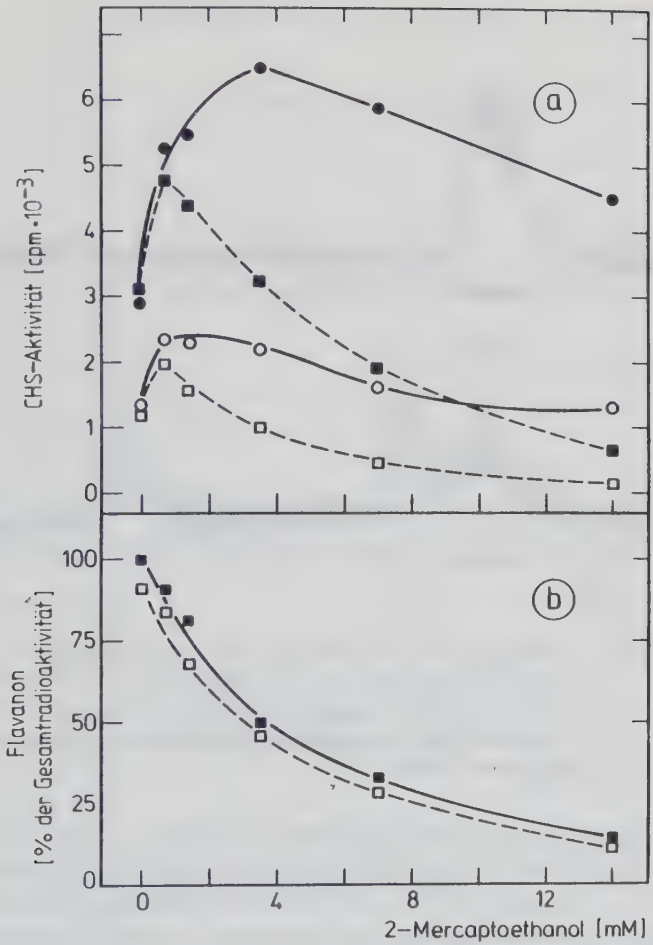


Abb 40 a) Abhängigkeit der CHS-Aktivität von der ME-Konzentration mit (●,■) und ohne BSA (○,□). Totale Radioaktivität (●,○); Naringenin (■,□)
b) Prozentualer Anteil des Naringenins an der totalen Radioaktivität in Abhängigkeit von der ME-Konzentration. Test mit BSA (■), Test ohne BSA (□) (BSA-Konz. im Test: 10mg/ml)

SPRIBILLE und FORKMANN 1982a, WHITEHEAD und DIXON 1983), es scheint sich dabei um eine generelle Eigenschaft der CHS zu handeln.

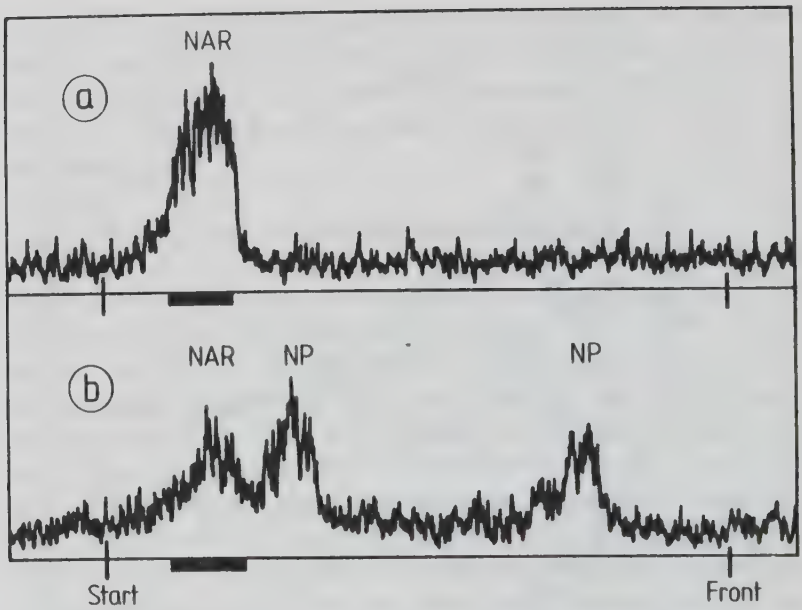


Abb. 41 Förderung von Nebenprodukten (NP) der CHS-Reaktion durch ME. Radiochromatogramme nach Chromatographie der Ethylacetatphase in Laufmittel I (siehe II.6.1.3.)
a) Kontrolle (1,4 mM ME), b) Test mit 7 mM ME
Dunkle Balken repäsentieren das im UV (366 nm) lokalisierte Naringenin (NAR)

BSA hatte eine stabilisierende Wirkung auf die CHS-Reaktion. In Abbildung 42 ist der Einfluß steigender BSA-Mengen im Test, mit und ohne ME, auf die CHS-Aktivität dargestellt. Bereits mit 0,5 mg BSA im Testansatz war die höchste Aktivität erreicht und konnte nicht weiter gesteigert werden. Bis 3,5 mg BSA trat keine Hemmung auf. Auch höhere Konzentrationen an BSA konnten die Steigerung der Nebenprodukte durch ME nicht verhindern. Ohne ME waren im Beisein von BSA keinerlei Nebenprodukte nachweisbar, die Werte der beiden Methoden zur CHS-Aktivitätsbestimmung waren nahezu identisch.

Die Experimente hatten gezeigt, daß ME und BSA die Aktivität der CHS unabhängig voneinander steigern. Beide Effekte

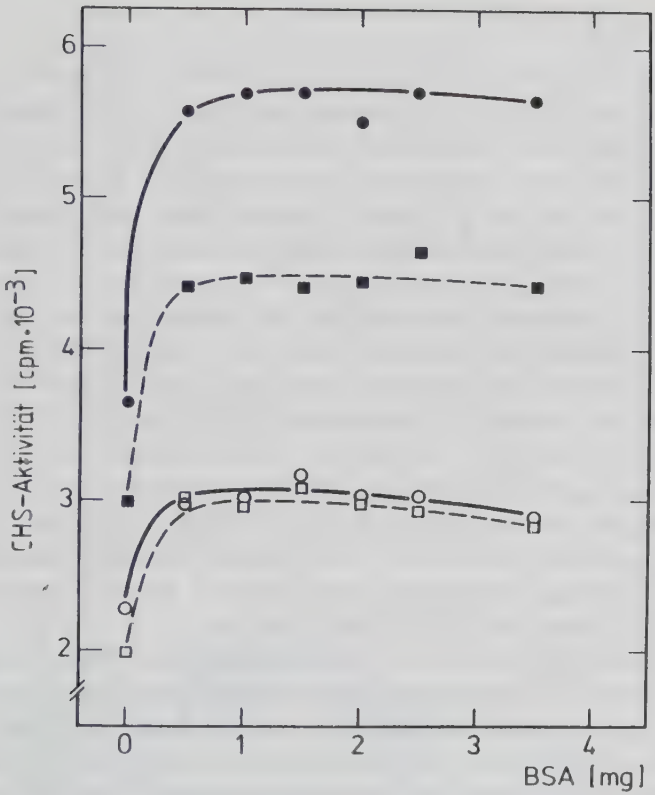


Abb. 42 Wirkung von BSA auf die CHS-Aktivität mit (●,■) und ohne (○,□) ME getestet. Totale Radioaktivität (●,○); Naringenin (■,□). ME-Konzentration im Test: 1,4 mM

waren synergistisch. Im Gegensatz zu ME hatte aber BSA keinen ungünstigen Einfluß auf die CHS-Reaktion. Selbst bei hohen BSA-Konzentrationen wurden keinerlei Nebenprodukte festgestellt. Nach diesen Erfahrungen erwies sich BSA als hervorragend geeignet für die Stabilisierung der CHS-Reaktion in vitro.

3.2.4. Abhängigkeit vom pH-Wert

Wurde Caffeoyl-CoA anstatt 4-Cumaroyl-CoA als Substrat verwendet, dann trat Eriodictyol als Reaktionsprodukt auf. Das pH-Optimum dieser Reaktion (6,8) unterschied sich deutlich von dem der Naringenin-Bildung (7,9)(Abb. 43a). Die pH-Optima der gesamten Produktbildung waren etwas zu höheren pH-Werten hin verschoben. Zwischen pH 6,0 und 7,0 waren die Raten der Naringenin- und Eriodictyol-Bildung ähnlich. Hingegen zwischen pH 7,0 und 8,0 war die Naringenin-Bildung beträchtlich höher. In diesem Bereich wurde mit Caffeoyl-CoA als Substrat die Bildung von Nebenprodukten bevorzugt. Die Darstellung in Abbildung 43b zeigt dies besser. Der Anteil der Flavanonprodukte an der Bildung der Gesamtprodukte fiel bei pH-Werten über 7,0 stark ab, von 80 % (pH 6,8) auf 10 % (pH 8,2). Mit 4-Cumaroyl-CoA als Substrat war der Anteil von Flavanon dagegen weniger beeinflußt, eine gewisse Abnahme war über pH 8,0 und unter pH 6,5 festzustellen.
In Abbildung 44 wurde die chromatographische Trennung der radioaktiven Reaktionsprodukte dargestellt. Mit 4-Cumaroyl-CoA als Substrat, bei pH 7,9, war die Produktbildung am größten, es konnte nur Naringenin nachgewiesen werden (Abb. 44a). Mit Caffeoyl-CoA als Substrat, bei pH 6,8, wurde Eriodictyol gebildet (Abb. 44b), mit deutlich geringerer Rate, während bei pH 7,9 kaum noch Eriodictyol, sondern überwiegend Nebenprodukte nachgewiesen wurden (Abb. 44 c).
Die pH-Abhängigkeit der CHS aus Suspensionskulturen, mit unterschiedlichen Optima für Naringenin- und Eriodictyol-Bildung, stimmt gut überein mit den für die Blüten-CHS ermittelten Daten (vergleiche III.1.3.). Verschiedene pH-Optima für 4-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA sind ebenso charakteristisch für die Synthasen aus Petersilie, *Haplopappus gracilis* (SALEH et al. 1978) und *Dianthus caryophyllus* (SPRIBILLE und FORKMANN 1982a).

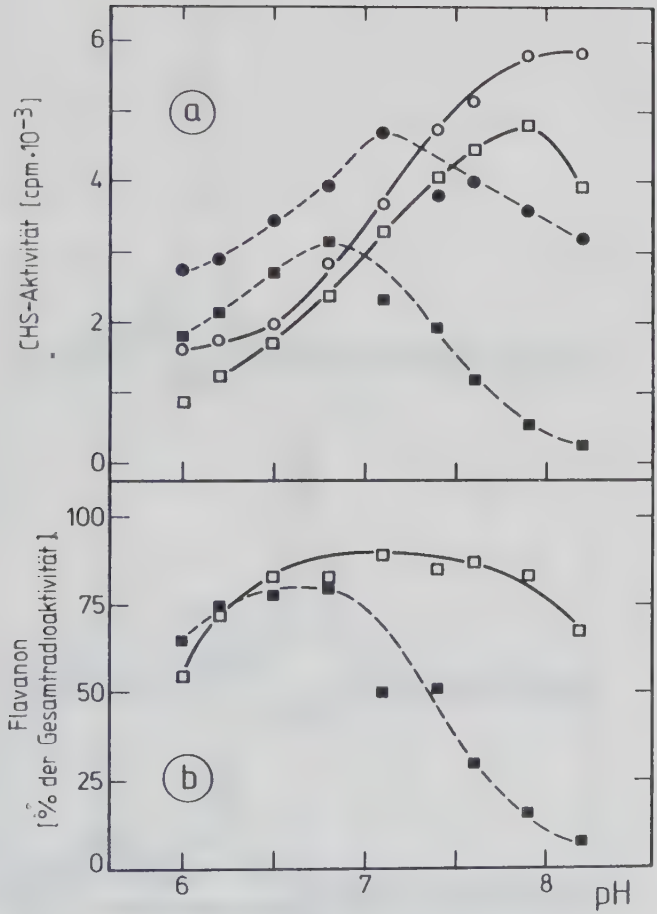


Abb. 43 a) pH-Abhängigkeit der CHS-Aktivität mit 4-Cumaroyl-CoA (○,□) und Caffeoyl-CoA (●,■) als Substrate. Totale Radioaktivität (○,●), Naringenin (□), Eriodictyol (■)
b) Prozentualer Flavanon-Anteil an der totalen Produktmenge. Naringenin (□), Eriodictyol (■)

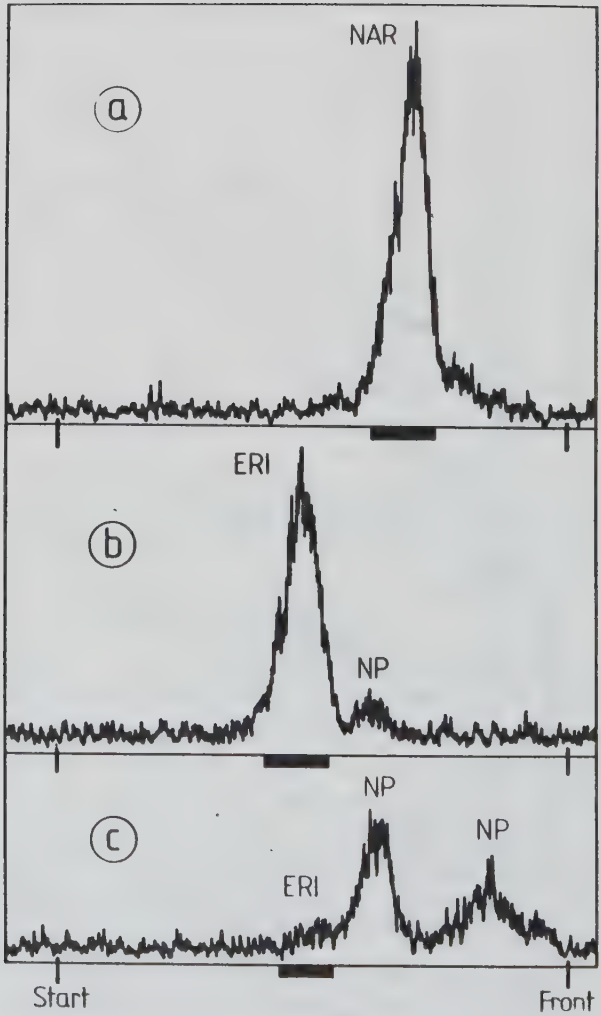


Abb. 44 Radiochromatogramme der CHS-Reaktionsprodukte verschiedener Testansätze nach Chromatographie in Laufmittel III (siehe II.6.1.3.)
a) 4-Cumaroyl-CoA als Substrat; pH 7,9, b) Caffeoyl-CoA als Substrat; pH 6,7, c) Caffeoyl-CoA als Substrat; pH 7,9
Die schwarzen Balken repräsentieren die unter UV (366 nm) sichtbaren Flavanon-Referenzen

Mit Caffeoyl-CoA als Substrat, bei pH-Werten über 7,0, bildete die CHS aus *Daucus carota* verstärkt Nebenprodukte. Vermutlich ist unter diesen Bedingungen die Reaktion bis zum Eriodictyol unterbrochen und das entsprechende Benzalaceton wird freigesetzt, so wie es für die CHS aus *Haplopappus gracilis* nachgewiesen wurde (SALEH et al. 1978).

3.2.5. Substratspezifität

Die Abhängigkeit der CHS-Aktivität von der Konzentration der Cinnamoyl-CoA-Substrate ist in Abbildung 45a dargestellt. Die Aktivitäten wurden mit den Flavanon-Werten berechnet. Die beiden Substrate wurden in ihrem jeweiligen pH-Optimum eingesetzt. Die Enzymaktivität war für Malonyl-CoA (18 µM) in Substratsättigung. Die Affinität der CHS gegenüber 4-Cumaroyl-CoA war wesentlich höher als für Caffeoyl-CoA.

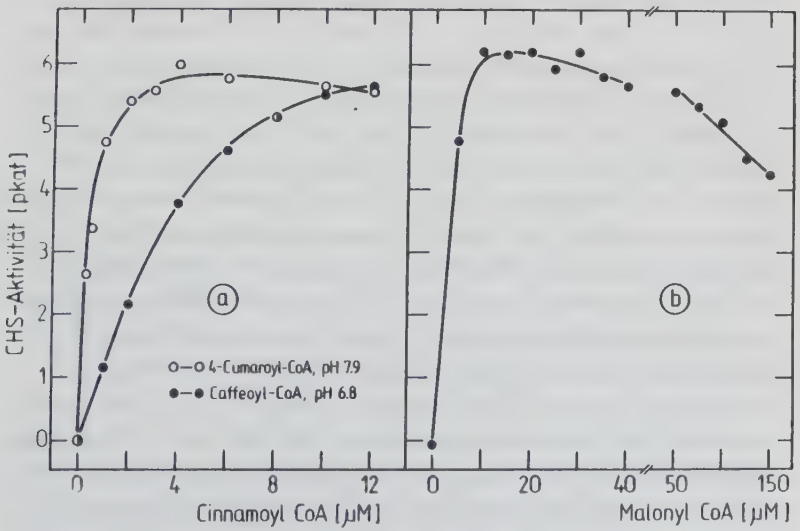


Abb. 45 Substratabhängigkeit der CHS-Aktivitäten wurden bestimmt mit den Flavanon-Werten. a) Abhängigkeit von der Cinnamoyl-Konzentration, b) Abhängigkeit von der Malonyl-Konzentration (mit 4-Cumaroyl-CoA; pH 7,9)

Mit 3 µM 4-Cumaroyl-CoA war die CHS-Aktivität bereits in Sättigung. Für Caffeoyl-CoA war dies erst bei 12 µM der Fall. Die Werte für V_{max} sind für beide Substrate etwa gleich.

Die Abhängigkeit von der Malonyl-CoA-Konzentration zeigt Abbildung 45b, die CHS-Aktivität wurde mit 4-Cumaroyl-CoA als Co-Substrat bestimmt (Naringeninwerte). Bei 10 µM Malonyl-CoA war die Enzymaktivität bereits gesättigt. Substrathemmung wurde ermittelt für Malonyl-CoA (> 50 µM) und 4-Cumaroyl-CoA (> 10 µM).

Die nach verschiedenen Methoden errechneten, bzw. graphisch ermittelten, apparenten K_m-Werte sind in Tabelle 13 zusammengefaßt. Die Unterschiede zwischen den beiden CHS-Bestimmungsmethoden für Caffeoyl-CoA und Malonyl-CoA kommen durch verstärkte Nebenproduktbildung bei niederen Substratkonzentrationen zustande.

Die CHS aus *Daucus carota* hatte eine hohe Spezifität für 4-Cumaroyl-CoA, die apparente K_m für die Naringenin-Bildung (Linewaever-Burk) betrug 0,6 µM. Dagegen war die Affinität für Caffeoyl-CoA mit einer apparenten K_m von 7,7 µM mehr als eine Größenordnung geringer. Für Malonyl-CoA wurde eine apparente K_m von 3,0 µM bestimmt, auch für dieses Substrat besaß die CHS eine hohe Affinität.

Durch diese Ergebnisse werden vorhergehende Schlußfolgerungen unterstützt, daß Caffeoyl-CoA kein natürliches Substrat der CHS darstellt. Die Hydroxylierung in 3'-Position erfolgt auf der Flavonoid-Stufe, wie durch die Supplementationsversuche demonstriert wurde. Unterschiedliche K_m-Werte für Cinnamoyl-CoA-Substrate wurden auch für das Enzym aus Petersilie gefunden (HRAZDINA et al. 1976). Ein wesentlicher Unterschied zwischen der CHS aus Karotte und Petersilie ist der deutlich geringere K_m-Wert des Karotten-Enzyms für Malonyl-CoA. Eine ähnlich hohe Affinität zu Malonyl-CoA besaß die CHS aus Tulpen-Antheren. Dieses Enzym unterscheidet sich aber durch gleiche pH-Optima und K_m-Werte für die Cinnamoyl-CoA-Substrate von der CHS aus

Tab. 13 Apparente K_m-Werte der CHS für die verschiedenen Substrate. Bestimmung nach verschiedenen Methoden

K_m (µM)		Substrate		
Methode der K_m-Bestimmung	Methode der CHS-Aktivitäts-bestimmung	4-Cumaroyl-CoA	Caffeoyl-CoA	Malonyl-CoA
Michaelis -	total	0,6	3,5	2,0
Menten	Flavanon	0,4	3,8	2,5
Lineweaver -	total	0,6	5,1	1,9
Burk	Flavanon	0,6	7,7	3,0
Eadie -	total	0,6	4,0	0,9
Hofstee	Flavanon	0,5	6,3	2,2

Daucus carota (SÜTFELD et al. 1978).

3.2.6. Einfluß verschiedener Phenylpropane auf die CHS-Reaktion

Für die Beschreibung der Regulation der CHS war es wichtig zu wissen, ob die Aktivität in vitro durch Metaboliten aus dem allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel und dem Flavonoidstoffwechsel beeinflußt werden kann. Die Wirkung der verschiedenen Substanzen (100 µM) auf die Naringenin- und Eriodictyol-Bildung wurde in Tabelle 14 zusammengestellt.

Neben den CHS-Produkten den Flavanonen bzw. Chalconen wurden noch weitere Flavonoid-Vorstufen der Anthocyane, sowie Zimtsäuren getestet. Außerdem wurde die Wirkung der Chlorogensäure, das Endprodukt eines alternativen Stoffwechselweges, untersucht. Von den verschiedenen organischen Lösungsmitteln, die getestet wurden (DMSO, EGME, Methanol) erwies sich DMSO als am wenigsten störend auf die CHS-Reaktion. Die Substanzen wurden in DMSO gelöst dem Test

Tab. 14 Wirkung verschiedener Phenylpropane auf die Produktbildung der CHS in vitro

Phenylpropan (100 µM)	Naringeninbildung (% der Kontrolle) (a	Eriodictyolbildung (% der Kontrolle) (b
Kontrolle	100	100
Naringenin	53	3
Naringeninchalcon (c	44	2
Eriodictyol	105	64
Eriodictyolchalcon (c	98	56
Dihydroquercetin	97	78
Quercetin	94	69
Cyanidin (c	86	82
Cyanidin 3,5-diglucosid	101	94
Chlorogensäure	105	120
t-Zimtsäure	96	84
4-Cumarsäure	107	71
Kaffeesäure	105	71

a) 4-Cumaroyl-CoA als Substrat; pH 7,9
b) Caffeoyl-CoA als Substrat; pH 6,8
c) Nicht stabil unter den Testbedingungen

zugesetzt (Endkonzentration von DMSO: 1 % v/v). Deutliche Hemmung der Naringenin-Bildung trat nur mit Naringenin und Naringeninchalcon auf (Tab. 14). Dazu muß erwähnt werden, daß die Chalcone während der Inkubation spontan zu Flavanonen isomerisieren. Die Reaktion mit Caffeoyl-CoA als Substrat, die zu Eriodictyol führt, war empfindlicher gegenüber dem Einfluß der getesteten Substanzen. Mit Naringenin und Naringenin-Chalcon wurde die Eriodictyol-Bildung nahezu vollständig gehemmt. Deutliche Hemmung trat ebenfalls auf mit Eriodictyol und Eriodictyolchalcon. Sogar Quercetin, Dihydroquercetin und die Zimtsäuren hatten gehemmt. Die Erhöhung der Aktivität mit Chlorogen-

säure war dagegen nicht signifikant.

Mit dem Ziel, den Mechanismus der Endprodukthemmung durch Naringenin aufzuklären, wurden Experimente durchgeführt, die in Abbildung 46 dargestellt sind. Gezeigt werden die doppelt reziproken Darstellungen der CHS-Aktivitäten als Funktion der 4-Cumaroyl-CoA-Konzentration in Anwesenheit verschiedener Inhibitor-Konzentrationen.

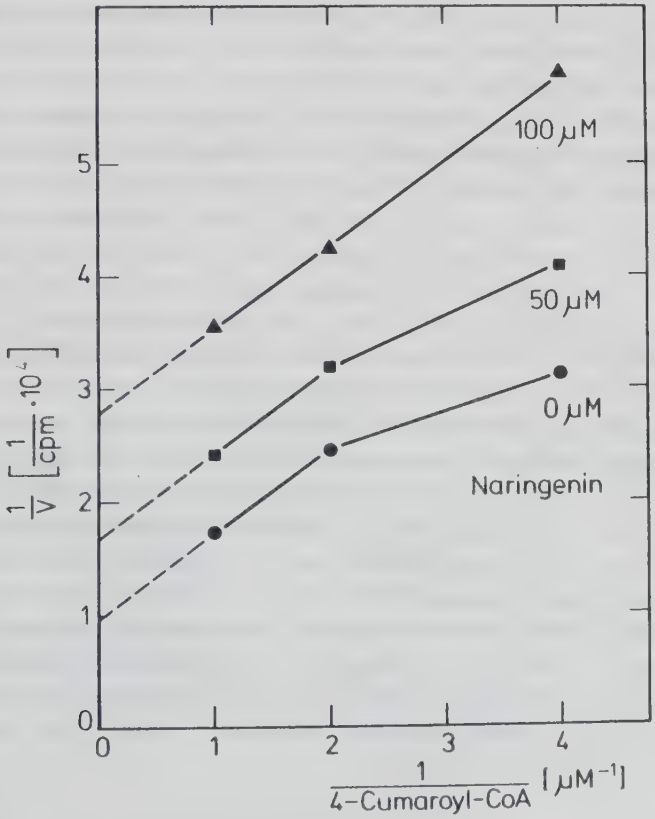


Abb. 46 Lineweaver - Burk Darstellungen der CHS-Aktivität als Funktion der 4-Cumaroyl-CoA-Konzentration im Beisein verschiedener Inhibitor-Konzentrationen

Die Erhöhung der K_m unter gleichzeitiger Erniedrigung von V_{max}, bei steigender Inhibitor-Konzentration, demonstriert die unkompetitive Hemmwirkung von Naringenin.
Wie bereits erwähnt, wurde die CHS aus Petersilie durch die Endprodukte der Reaktion CoA-SH und Naringenin bzw. Naringeninchalcon, gehemmt (KREUZALER und HAHLBROCK 1975b). Über die CHS aus *Phaseolus vulgaris* wurde berichtet, daß sie durch das Isoflavanon Kieviton, einem Phytoallexin der Bohne, in einem nicht-kompetitiven Mechanismus gehemmt wurde (WHITEHEAD und DIXON 1983).
Bei der CHS aus *Daucus carota* konnte die Naringenin-Bildung durch Naringenin und dem isomeren Chalcon gehemmt werden. Alle anderen getesteten Phenylpropane, auch Eriodictyol und Eriodictyolchalcon, waren unwirksam. In Analogie zur Substratspezifität verliert auch das Flavanon (bzw. Chalcon) seine Hemmaktivität mit dem Auftreten einer zweiten Hydroxylgruppe in 3'-Position des B-Rings. Die Eriodictyol-Bildung wurde durch Naringenin und Naringeninchalcon stärker gehemmt. Mehrere Phenylpropane, die auf die Naringenin-Bildung ohne Wirkung blieben, hatten Hemmung bewirkt. Dies lag wohl daran, daß die CHS für Caffeoyl-CoA eine höhere K_m besaß, dieses Substrat war unter den Testbedingungen nicht in Substratsättigung. Daraus wurde geschlossen, daß die Hemmung von der Konzentration der Cinnamoyl-CoA-Substrate abhängt. Die Ergebnisse mit Naringenin als Inhibitor hatten dies bestätigt. Aus dem ermittelten unkompetitiven Hemmechanismus kann geschlossen werden, daß Naringenin nicht auf die Bindungsstelle von 4-Cumaroyl-CoA einwirkt.

4. In vitro-Versuche II: Teilweise Reinigung und Charakterisierung der Hemmaktivität aus Suspensionskulturen

Aus DC_w-Kalluskulturen wurde in vorangegangenen Arbeiten ein Protein isoliert, das in Mischexperimenten Hemmaktivität auf CHS besaß. Das Protein hatte ein MG > 10 000. Die Hemmaktivität war hitzelabil und spezifisch für die CHS-Reaktion (HINDERER 1982).
Ein Hauptziel dieser Arbeit war dieses Hemmprinzip und seine Bedeutung für die Regulation der CHS aufzuklären. Dazu erschien es sinnvoll die Hemmaktivität zu reinigen. Vorversuche hatten gezeigt, daß die Hemmaktivität auch in Suspensionskulturen, die aus DC_w-Kallus angelegt wurden, vorhanden war.

4.1. Reinigung der Hemmaktivität

Es erfolgten gleiche Reinigungsschritte wie bei der CHS. Nur die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung wurde abgeändert. Bei der Chromatographie an Ionenaustauschern wurden wieder alternativ Trennungen auf der DEAE-Sephacel-Säule und auf der Mono Q-Säule durchgeführt.
Die einzelnen Schritte waren:

a) für DEAE-Sephacel
1. Dowex-Überstand
2. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung 60-80 %
3. Sephadex G-25
4. DEAE-Sephacel
5. Ultrafiltration

b) für Mono Q
1. Dowex-Überstand
2. Ammoniumsulfatfällung 0-85 %
3. Sephadex G-25
4. Ultrafiltration, Lagerung bei -20 °C (mehrere Tage)
5. Mono Q (nur mit Teil aus 4.)
6. Ultrafiltration

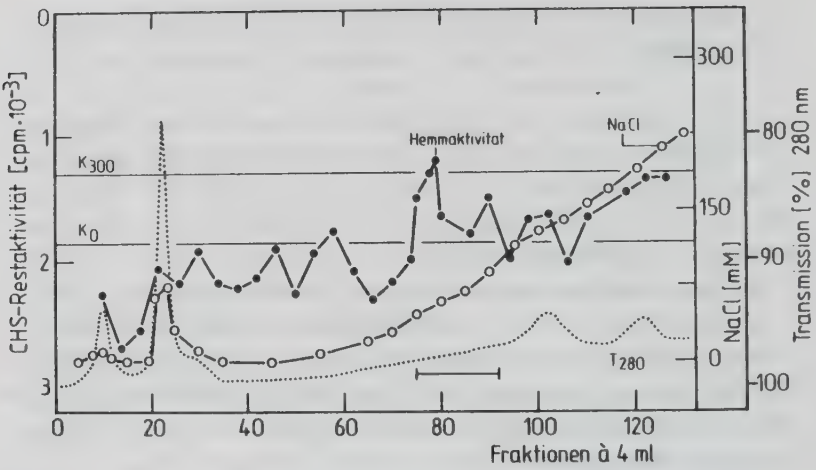


Abb. 47 Elutionsprofil der Hemmaktivität auf der DEAE-Sephacel-säule. Fraktion getestet auf partiell gereinigter CHS. Kontrollen mit Puffer ohne NaCl (K_0) und mit 300 mM NaCl (K_{300})

● —— ● CHS-Restaktivität
o —— o NaCl
····· Transmission 280 nm
|——| vereinigte Fraktionen

Das Elutionsprofil der Hemmaktivität auf der DEAE-Sephacel-Säule zeigt Abbildung 47. Die Fraktionen mit der deutlichsten Hemmung (75-92) wurden gesammelt und eingeengt. Hier konnte eine Hemmaktivität angereichert werden. Der Anstieg der Hemmung in den späteren Fraktionen war unspezifisch und wurde durch hohe Salzkonzentrationen verursacht.
Eine nahezu ideale Trennung ergab sich auf der Mono Q-Säule (Abb. 48). Die Hemmaktivität wurde in einem Bereich mit minimaler Proteinkonzentration (OD 280) eluiert, etwa bei 70 mM NaCl. Auch hier stieg die Hemmung in den letzten Fraktionen, durch die hohe Salzkonzentration verursacht, an.
Reinigungsfaktoren konnten nicht ermittelt werden, da die Hemmaktivität keine lineare Zeit- und auch keine lineare

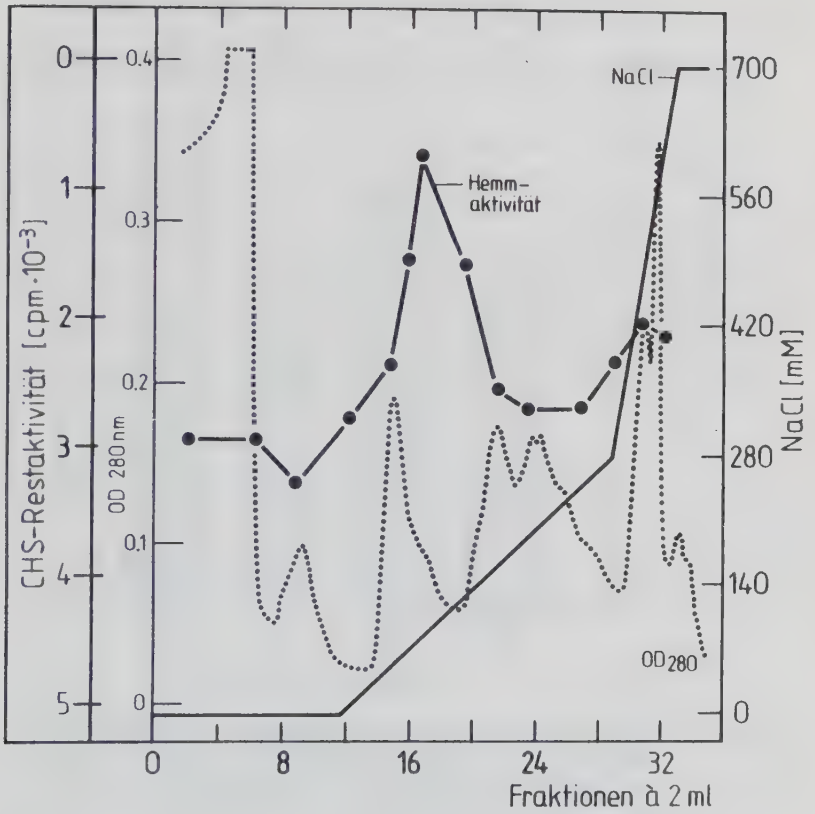


Abb. 48 Elutionsprofil der Hemmaktivität auf der Mono Q-Säule (FPLC-System). Fraktionen getestet mit partiell gereinigter CHS.
●——● CHS-Restaktivität
——— NaCl
····· OD 280 nm

Proteinabhängigkeit besaß. Abbildung 49 zeigt den Hemmeffekt nach verschiedenen Reinigungsschritten, in Prozent der Kontrollen mit gekochten Extrakten. Eine sehr gute Trennung ergab der Schritt auf der Mono Q-Säule. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Proteinmengen die eingesetzt wurden, wird die Zunahme der "spezifischen Hemmaktivität" auch in den anderen Schritten deutlich.

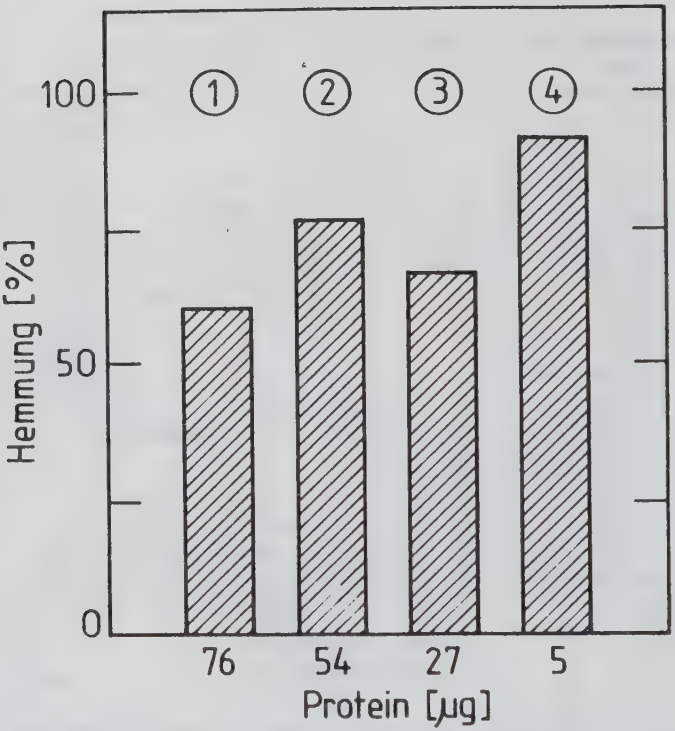


Abb. 49 Hemmaktivität (in %) der verschiedenen Reinigungsschritte gegenüber Kontrollen mit gekochten Extrakten
1) Dowex-Überstand, 2) 60-80 % Ammoniumsulfat-Präzipitat, Sephadex G-25, 3) DEAE-Sephacel, ultrafiltriert, 4) Mono Q, ultrafiltriert

Auf der Mono Q-Säule hatte man eindeutig den besten Reinigungseffekt. Kalkulationen auf der Basis der Proteinmenge für 50 % Hemmung, ergaben eine Reinigung von mindestens 50 fach gegenüber dem Rohextrakt.
Die gesamte Charakterisierung und Identifizierung der Hemmaktivität wurde mit der über die Mono Q-Säule gereinigten Präparation durchgeführt.

4.2. Molekulare Grundlagen der Hemmung, Identifizierung des "Inhibitors" als 3'-Nucleotidase

4.2.1. Wirkung der Hemmaktivität auf die CHS-Substrate

Experimente, bei denen die Extrakte (mit Hemmaktivität) mit den CHS-Substraten vorinkubiert wurden, zeigten im Falle von Malonyl-CoA eine eindeutige Verstärkung der Hemmung. Durch Erhöhen der Malonyl-CoA-Konzentration im Test konnte die Hemmung revertiert werden. Chromatographische Analysen hatten gezeigt, daß sowohl für Malonyl-CoA als auch für 4-Cumaroyl-CoA, nach Inkubation mit der Hemmaktivität, neue Produkte mit höheren R_f-Werten in Laufmittel IV (siehe II.6.1.3.) auftraten.
Abbildung 50a zeigt die Lokalisation eines unbekannten Produkts im Radiochromatogramm, nach Inkubation von ^{14}C-Malonyl-CoA mit partiell gereinigter Hemmaktivität (30 min, 30 °C). Bei der Kontrolle (Abb. 50b) wurde Malonyl-CoA mit hitzedenaturiertem Protein inkubiert. Das unbekannte Produkt wurde später als 3'-Dephospho-Malonyl-CoA identifiziert. Die Bildung der Produkte erfolgte zeitabhängig, die Umsetzungsrate hing wiederum von der eingesetzten Proteinkonzentration ab. Es lag nahe, eine enzymatische Reaktion zu vermuten. Nach Elution der Produkte aus den DC-Platten und Einbringen in den CHS-Test, zeigte sich für das Malonyl-CoA-Derivat kein Einbau in Naringenin, hingegen besaß das Derivat von 4-Cumaroyl-CoA nach wie vor Substrataktivität im CHS-Test.
Damit war zu diesem Zeitpunkt klar, daß es sich bei der Hemmaktivität um ein Enzym handelt, das mit der CHS in Konkurrenz um die Substrate tritt. Da beide Substrate verändert wurden, wurde vermutet, daß der CoA-Teil der Substrate betroffen war. Die für die Hemmung entscheidende Reaktion fand mit Malonyl-CoA statt, deswegen wurde in folgenden Experimenten versucht, das Malonyl-CoA-Derivat zu identifizieren. Enzymatischer Abbau wurde vermutet.

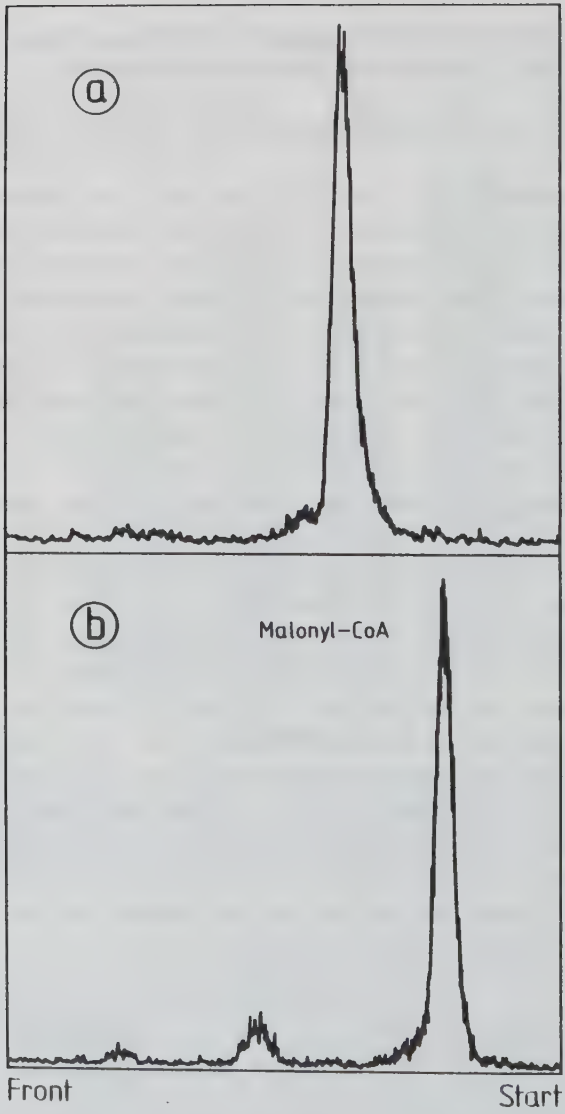


Abb. 50 Produkt der partiell gereinigten Hemmaktivität mit Malonyl-CoA als Substrat. Chromatographie des gesamten Testansatzes in Laufmittel IV (siehe II.6.1.3.)
a) Inkubation für 30 min bei 30 °C; das unbekannte Produkt wurde später als 3'-Dephospho-Malonyl-CoA identifiziert
b) Kontrolle, Inkubation mit hitzedenaturiertem Protein

Nach und nach konnten ausgeschlossen werden: Acetyl-CoA (Decarboxylase), Malonat (Thioesterase), Malonyl-4'-Phosphopantethein (Pyrophosphatase) (siehe Abb. 51).

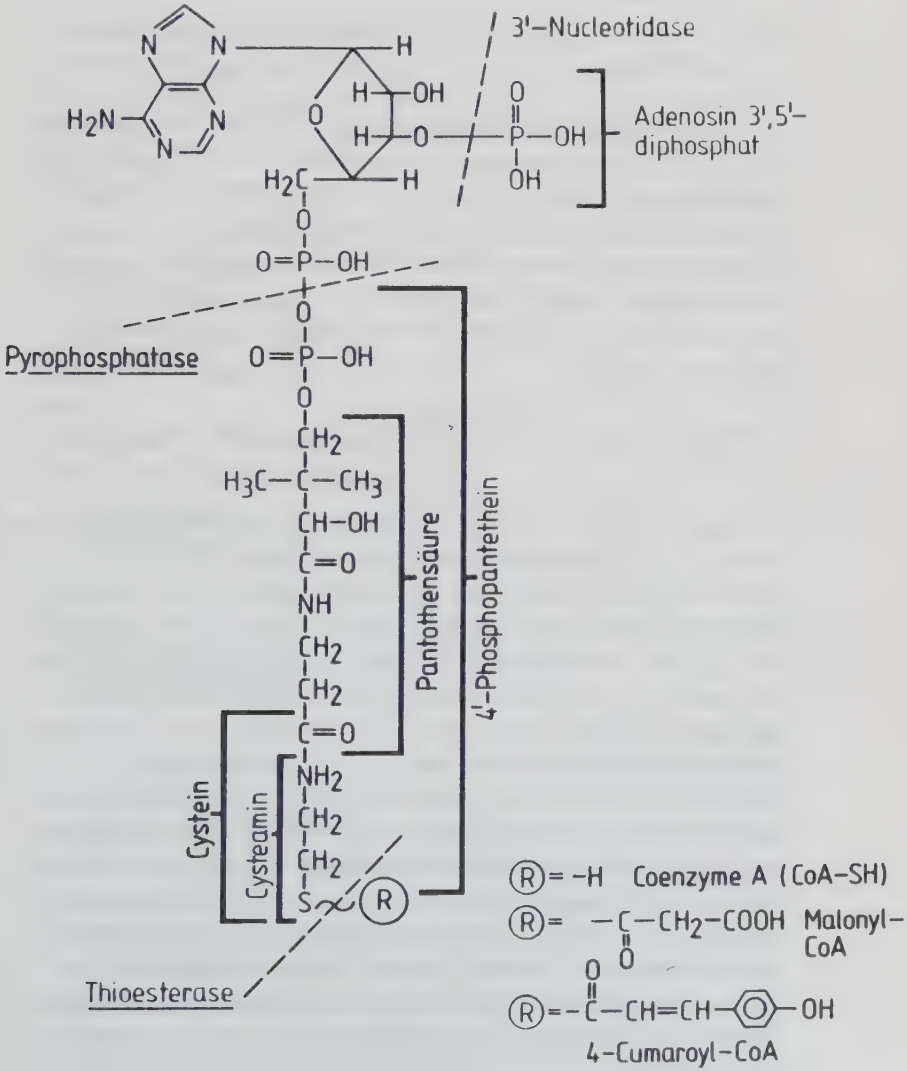


Abb. 51 Struktur der CHS-Substrate und mögliche Angriffsstellen spaltender Enzyme

Spektroskopische Analysen zeigten keine Unterschiede zwischen den CHS-Substraten und ihren Derivaten, daraus konnte geschlossen werden, daß der Adenin-Teil (Absorption bei 259 nm) nicht abgespalten wurde.

4.2.2. Charakterisierung der 3'-Nucleotidase aus *Daucus carota*

Die Identifizierung der Hemmaktivität als 3'-Nucleotidase (EC. 3.1.3.6.) gelang durch Bestimmung von freigesetztem anorganischen Phosphat aus den CHS-Substraten, anderen CoA-Verbindungen, sowie aus 3'-Nucleotiden.
3'-Nucleotidase unterscheidet sich von anderen Monophosphatasen durch eine hohe Spezifität für 3'-Ribonucleotide und durch ein pH-Optimum im neutralen Bereich (SHUSTER und KAPLAN 1953).

$$\text{3'-Ribonucleotid} \xrightarrow[+\ H_2O]{\text{3'-Nucleotidase}} \text{Ribonucleosid} + Pi$$

Die Substratspezifität der 3'-Nucleotidase-Präparation aus *Daucus carota* (Hemmaktivität) zeigt Tabelle 15. Die Aktivität hatte eine hohe Spezifität für 3'-Nucleotide. Bestes Substrat war 3'-AMP, gefolgt von 3',5'-ADP, Acetyl-CoA, Malonyl-CoA und CoA-SH. Die Spezifität gegenüber der Base war geringer, auch Guanosin 3'(2') monophosphat wurde dephosphoriliert. Die Präparation war frei von Pyrophosphatase-Aktivität, hatte aber eine noch geringe Phosphodiesterase-Aktivität mit cAMP (2':3') als Substrat. $MgCl_2$ verbesserte die Substratspezifität, unter diesen Bedingungen wurden keine 5'-Nucleotide dephosphoriliert. Eine sehr geringe Aktivität war mit 2'-Nucleotiden (2'-AMP, NADP) vorhanden, während Glucose 6-phosphat sowie DNA und RNA inert waren. Dieses Substratverhalten war nahezu identisch mit der erstmals von SHUSTER und KAPLAN (1953) beschriebenen 3'-Nucleotidase aus *Lolium multiflorum*.

Tab. 15 Spezifität der 3'-Nucleotidase aus *Daucus carota* bei pH 7,0

Substrat (1mM)	Freisetzung von Phosphat (%)
Adenosin 3'-monophosphat	100
Adenosin 3',5'-diphosphat	83
Acetyl-CoA	68
Malonyl-CoA	53
CoA-SH	53 / 59 (a
Guanosin 3'(2')monophosphat	29
Adenosin 5'-triphosphat	14 / 0 (a
Adenosin 5'-diphosphat	3 / 0 (a
Adenosin 5'-monophosphat	11 / 0 (a
Adenosin 2'-monophophat	2
NADP	4
Adenosin (2': 3')monophosphat (cyclisch)	14
Adenosin (3': 5')monophosphat (cyclisch)	0
Glucose-6-phosphat	0
DNA (Kalbsthymus) (b	0
RNA (*E. coli*) (b	0

a) Zusätzlich getestet mit 10 mM $MgCl_2$
b) Endkonzentration: 1 mg/ml

Die pH-Abhängigkeit der 3'-Nucleotidase-Aktivität wurde mit CoA-SH als Substrat getestet. sie zeigt das typische pH-Optimum im neutralen Bereich (7,0) (Abb. 52). Das etwas geringere pH-Optimum gegenüber dem Enzym aus *Lolium multiflorum* (7,5) kann durch die Anwesenheit von SH-Gruppen (CoA-SH als Substrat) erklärt werden, unter solchen Bedingungen erfolgt eine Verschiebung des pH-Optimums zu sauren Werten hin (SHUSTER 1958).
Sowohl in ihrem Substratverhalten als auch in der pH-Abhängigkeit zeigte das Enzym aus Karotten Übereinstimmung mit 3'-Nucleotidase aus anderen Arten (SHUSTER und

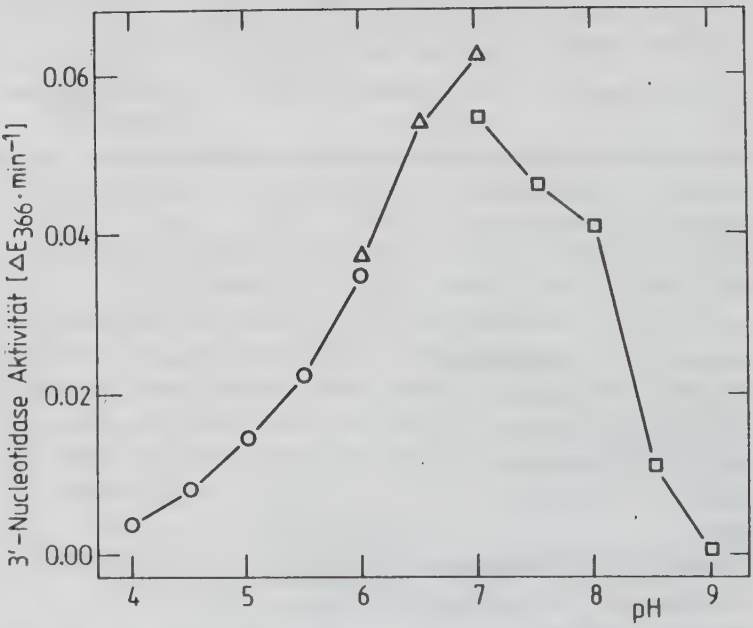


Abb. 52 pH-Optimum der 3'-Nucleotidase aus *Daucus carota* mit CoA-SH als Substrat. Verwendete Puffer (100 mM): Na-Acetat (○), Bis-Tris/HCl (△), Tris/HCl (□)

KAPLAN 1953, LORING et al. 1966, SASAKUMA und OLESON 1979). Nach der Identifizierung der Hemmaktivität als 3'-Nucleotidase konnten auch die in vitro gebildeten, modifizierten CHS-Substrate als die entsprechenden 3'-DP-Derivate identifiziert werden. Dies gelang durch Co-Chromatographie mit Referenz-Substanzen, die mit Hilfe von gereinigter 3'-Nucleotidase aus *Lolium multiflorum* (Sigma, München) hergestellt wurden (siehe II.12.3.). Außerdem konnte durch Behandlung der CHS-Substrat-Derivate mit diesem Enzym keine Freisetzung von Phosphat bestimmt werden.
Die Identifizierung gelang also letztlich durch Vergleich mit authentischer 3'-Nucleotidase.

Das partiell gereinigte Enzym aus *Daucus carota* hatte eine sehr hohe spezifische Aktivität von 0,8 kat/kg. Das gereinigte Sigma-Präparat hatte zum Vergleich eine spezifische Aktivität von 2,4 kat/kg.

4.2.3. Hemmung der CHS mit 3'-Nucleotidase aus *Lolium multiflorum* und CoA-Derivaten

Durch die Hemmung der CHS mit gereinigter 3'-Nucleotidase auch aus *Lolium multiflorum* konnten die bisherigen Ergebnisse zusätzlich abgesichert werden. Dieses Präparat war frei von Pyrophosphatase-Aktivität. Produktanalysen hatten gezeigt, daß die CHS-Substrate zu 100 % in die entsprechenden 3'-Dephosphorilierten Verbindungen überführt wurden. Die Hemmung der CHS mit diesem Enzym erfolgte unter den Standardtestbedingungen für die CHS, d.h. in Phosphatpuffer 100 mM, pH 8,0; mit 1,4 mM mE und bei 30 °C. Die 3'-Nucleotidase arbeitet optimal bei pH 7,5; 37 °C und wird gehemmt durch anorganisches Phosphat und SH-Gruppen (SHUSTER und KAPLAN 1953, SHUSTER 1958). Die CHS-Testbedingungen sind also nicht optimal für die 3'-Nucleotidase. Trotz dieser ungünstigen Bedingungen war noch genügend Aktivität für eine deutliche Hemmung vorhanden. Das Ausmaß der Hemmung war abhängig von der eingesetzten Aktivität (Abb. 53) und war größer, wenn die Substrate mit der 3'-Nucleotidase vorinkubiert waren. Die Hemmung wirkte sich auf die Naringenin-Bildung stärker aus als auf die gesamte Produktbildung (Abb. 53b), d.h. ein gewisser Anteil an Nicht-Flavanon-Produkten (25 %) könnte auch mit 3'-DP-Malonyl-CoA gebildet worden sein. Vermutlich steckt dahinter aber die Eigenschaft der CHS bei suboptimalen Malonyl-CoA-Konzentrationen bevorzugt Nebenprodukte zu bilden (siehe III.3.2.5.). Sehr interessant war die Tatsache, daß 3'-DP-4-Cumaroyl-CoA im Gegensatz zu 3'-DP-Malonyl-CoA Substrataktivität besaß. Entsprechendes gilt auch für die 4'-Phosphopantethein-Ester (Tabelle 16). Die Hemmung kommt also durch Inaktivierung von Malonyl-CoA

Tab. 16 Substrataktivität verschiedener Derivate der CHS-Substrate im CHS-Test

Substrat	3'-DP-4-Cumaroyl-CoA	4-Cumaroyl-4'-Phospho-pantethein	3'-DP-Malonyl-CoA	Malonyl-4'-Phospho-pantethein
Aktivität im CHS-Test	+	+	—	—

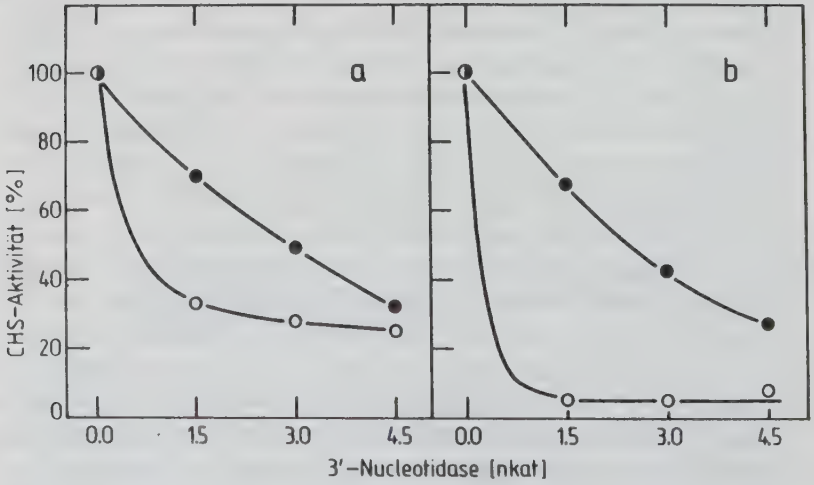


Abb. 53 Hemmung der CHS aus *Daucus carota* mit 3'-Nucleotidase aus *Lolium multiflorum*. a) Totale Radioaktivität, b) Naringenin. Standardtest, 30 min (●); Substrate vorinkubiert für 30 min mit 3'-Nucleotidase (○)

zustande. 3'-DP-Malonyl-CoA war nicht nur inaktiv sondern auch ein effektiver Inhibitor (Abbildung 54). Bei 3 µM betrug die Hemmung der Naringenin-Bildung 50 %. Die Hemmung war reversibel, durch Erhöhen der Malonyl-CoA-Konzentration konnte sie verringert werden (ohne Abb.)

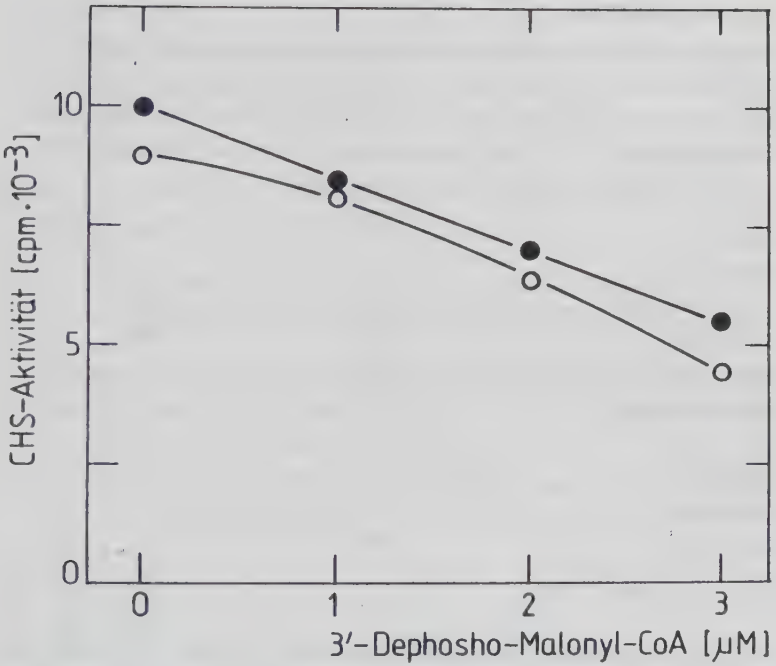


Abb. 54 Hemmung der CHS mit 3'-Dephospho-Malonyl-CoA.
Radioaktivität total (●); Naringenin (○)

Die Substratkonzentration von Malonyl-CoA betrug im Standardtest ca. 10 µM. Bei Dephosphorilierung der Hälfte des Substrats würde die Aktivität auf Grund der geringeren Substratkonzentration (5 µM) etwa um 25 % abgenommen haben (vgl. Abb. 45b), aber durch die Konzentration von 5 µM 3'-DP-Malonyl-CoA würde die Hemmung weit über 50 % erfolgen (vgl. Abb. 54). Diese Kalkulation macht deutlich, daß die Hemmung in erster Linie durch das Auftreten der Inhibitorsubstanz 3'-DP-Malonyl-CoA zustande kam und erst an zweiter Stelle durch Mangel an Malonyl-CoA.
In den folgenden Experimenten wurden weitere Fragmente von Malonyl-CoA (vgl. Abb. 51) auf Hemmaktivität unter-

Tab. 17 Einfluß verschiedener Fragmente von Malonyl-CoA auf die CHS-Aktivität

Substanz	Naringenin (% der Kontrolle)	
	100 µM	10 µM
Kontrolle	100	100
CoA-SH	14	77
3'-DP-CoA-SH	78	96
Acetyl-CoA	34	99
Pantethein	106	-
Pantothensäure	102	-
3',5'-ADP	103	-
Cystein	105	-
Cysteamin	111	-
Malonsäure	109	-

sucht (Tabelle 17). Bei 100 µM Konzentration wirkten CoA-SH, Acetyl-CoA und 3'-DP-CoA-SH hemmend. Bei 10 µM Konzentrationen zeigte nur noch CoA-SH signifikante Hemmung. In Analogie zu Malonyl-CoA, das durch Dephosphorilierung seine Substrataktivität einbüßte, verlor auch CoA-SH seine Hemmaktivität nach Dephosphorilierung in 3'-Position. Pantethein hatte keine Hemmaktivität bis 100 µM. Dies war sehr überraschend, denn CHS aus Petersilie wurde effektiv durch Pantethein gehemmt, bei Konzentrationen, die auch für CoA-SH wirksam waren (KREUZALER und HAHLBROCK 1975b). Diese Hemmung kam dadurch zustande, daß die Petersilie-CHS Malonyl-Pantethein gebildet hatte. Die Bildung von Malonyl-Pantethein mit CHS aus *Daucus carota* kann nicht ausgeschlossen werden, denn dieses Produkt wurde mit dem Standard-CHS-Test nicht erfaßt, in Gegenwart von 4-Cumaroyl-CoA kann sie aber nur sehr gering sein, denn die

Naringenin-Bildung wurde durch 100 µM Pantethein nicht beeinflußt.

Die Ergebnisse hatten gezeigt, daß die 3'-Phosphatgruppe von Malonyl-CoA eine wichtige Funktion beim Bindungsvorgang an das Enzym, bzw. bei einem der folgenden Schritte besitzt. Ob diese Phosphatgruppe auch eine Regulationsstelle, z.B. im Zusammenhang mit der GA_3-Wirkung, darstellt, ist noch nicht geklärt.

4.3. Versuche zur Trennung der 3'-Nucleotidase von anderen Monophosphatasen und von der CHS

Nachdem die Hemmaktivität als 3'-Nucleotidase identifiziert wurde, lag es nahe, den Einfluß von GA_3 auf dieses Enzym zu untersuchen.

Ein solches Experiment ist in Abbildung 55 dargestellt.

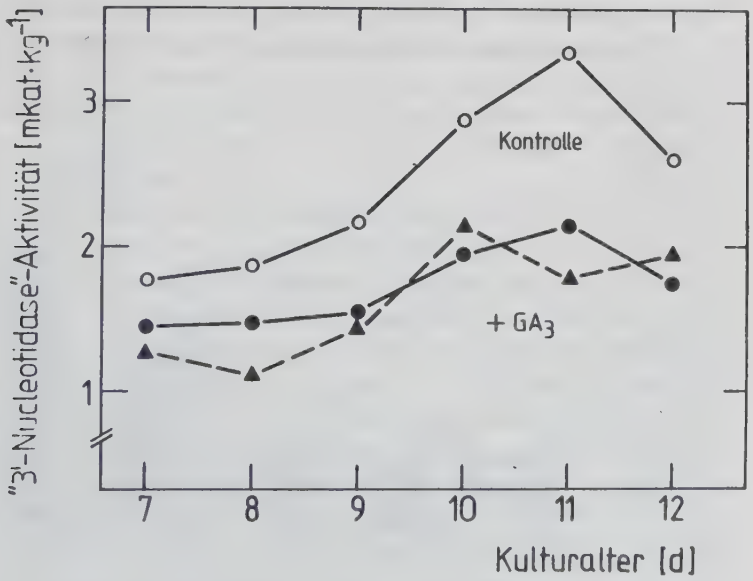


Abb. 55 Wirkung von GA_3 (30 µM) auf die Monophosphatase-Aktivität mit 3'-AMP als Substrat ("3'-Nucleotidase") in Rohextrakten. Kontrolle ohne GA_3 (○); GA_3 am 7. Tag zugegeben (●); GA_3 am 0. Tag zugegeben (▲)

Die Kontrolle besaß ein Maximum der spezifischen Aktivität am 11. Kulturtag. GA_3 wurde in einem Fall am 7. Tag, in einem Parallelexperiment am 0. Tag zugegeben. Die GA_3-Wirkung war genau entgegengesetzt wie erwartet, die Aktivität wurde deutlich abgesenkt. Die Enzymbestimmungen erfolgten mit Rohextrakten (Dowex-Überstand). Eine Überprüfung der Substratspezifität ergab Phosphatfreisetzung mit 3'-AMP, 2'-AMP, 5'-AMP und Glucose 6-phosphat mit etwa gleicher Aktivität. Die 3'-Nucleotidase konnte nicht aus Rohextrakten gemessen werden, da andere Phosphatasen störten.

In weiteren Experimenten wurde versucht, die 3'-Nucleotidase von den anderen Phosphatasen zu trennen. In gleicher Weise wie die Hemmaktivität angereichert wurde, konnte auch die Phosphatase-Aktivität mit 3'-AMP als Substrat erhöht werden (Abb. 56). Es wurden Zellen aus einer anthocyanproduzierenden und solche aus einer anthocyanfreien

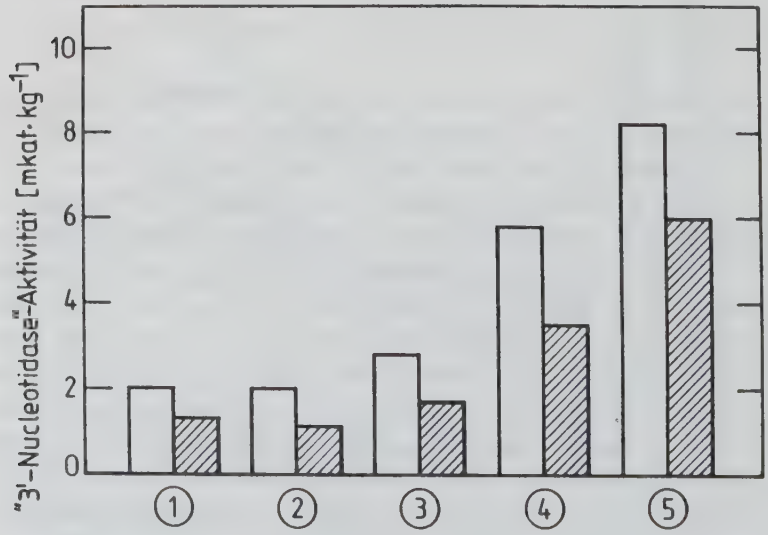


Abb. 56 Spezifische Monophosphatase-Aktivität mit 3'AMP als Substrat ("3'-Nucleotidase") in verschiedenen Aufarbeitungsschritten.
anthocyanfreie Zellen □ anthocyanhaltige Zellen ▨
1) Rohhomogenat, 2) 25 000 g Überstand, 3) Dowex-Überstand, 4) Ammoniumsulfatfällung 60–80 %, 5) Sephadex G-25

Suspensionskultur parallel aufgearbeitet. Die anthocyanfreien Zellen (GA_3-Kultur) besaßen deutlich höhere spezifische Aktivitäten. Das entsalzte Ammoniumsulfat-Präzipitat (60 - 80 %) hatte gegenüber dem Rohextrakt 4,2-fache spezifische Aktivität. Leider wurde die Substratspezifität gegenüber 3'-Nucleotiden nur unwesentlich verbessert. Alle angebotenen Monophosphate wurden dephosphoriliert.

Als nächster Reinigungsschritt erfolgte eine Trennung auf der Mono Q-Säule. Die 60 - 80 % Ammoniumsulfat-präzipitierte Proteinfraktion aus der anthocyanhaltigen und der anthocyanfreien Kultur wurden parallel aufgetrennt. Sämtliche Fraktionen wurden auf CHS-Aktivität und Phosphatase-Aktivität mit verschiedenen Substraten (3'-AMP, 5'-AMP, Glucose 6-phosphat) getestet. Abbildung 57a zeigt das Elutionsprofil der CHS und der Phosphatase-Aktivitäten mit 3'-AMP als Substrat, mit Proteinfraktion aus weißen Zellen. In keiner Fraktion war eine signifikante CHS-Aktivität vorhanden. Dagegen wurden mindestens vier verschiedene Proteine mit Phosphatase-Aktivität getrennt. Der Hauptgipfel wurde begrenzt durch die obere Nachweisgrenze des Tests.

Die Substratspezifität der getrennten Aktivitäten zeigt Abbildung 57b. Mit Ausnahme der Aktivität in Fraktion Nr. 20, besaßen alle anderen deutlich geringere Aktivität mit 5'-AMP und Glucose 6-phosphat als Substrat. Hohe Sepzifität gegenüber 3'-Phosphat besaßen die Aktivitäten in Fraktion Nr. 3, 13 und 17. Auch für die Hauptaktivität (Nr. 8 - 10) war 3'-AMP das beste Substrat. Diese Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert durch Ultrafiltration und auf Hemmung im CHS-Test überprüft. Es zeigte sich jedoch keine Hemmung.

Die Abbildungen 58a und b zeigen die Elutionsprofile mit Protein aus anthocyanhaltigen Zellen. Hier war eine hohe CHS-Aktivität vorhanden, die im Gegensatz zu der Trennung bei 3.1.4., diesmal durch Ultrafiltration stabilisiert werden konnte, die Aktivität ging beim Einfrieren nicht

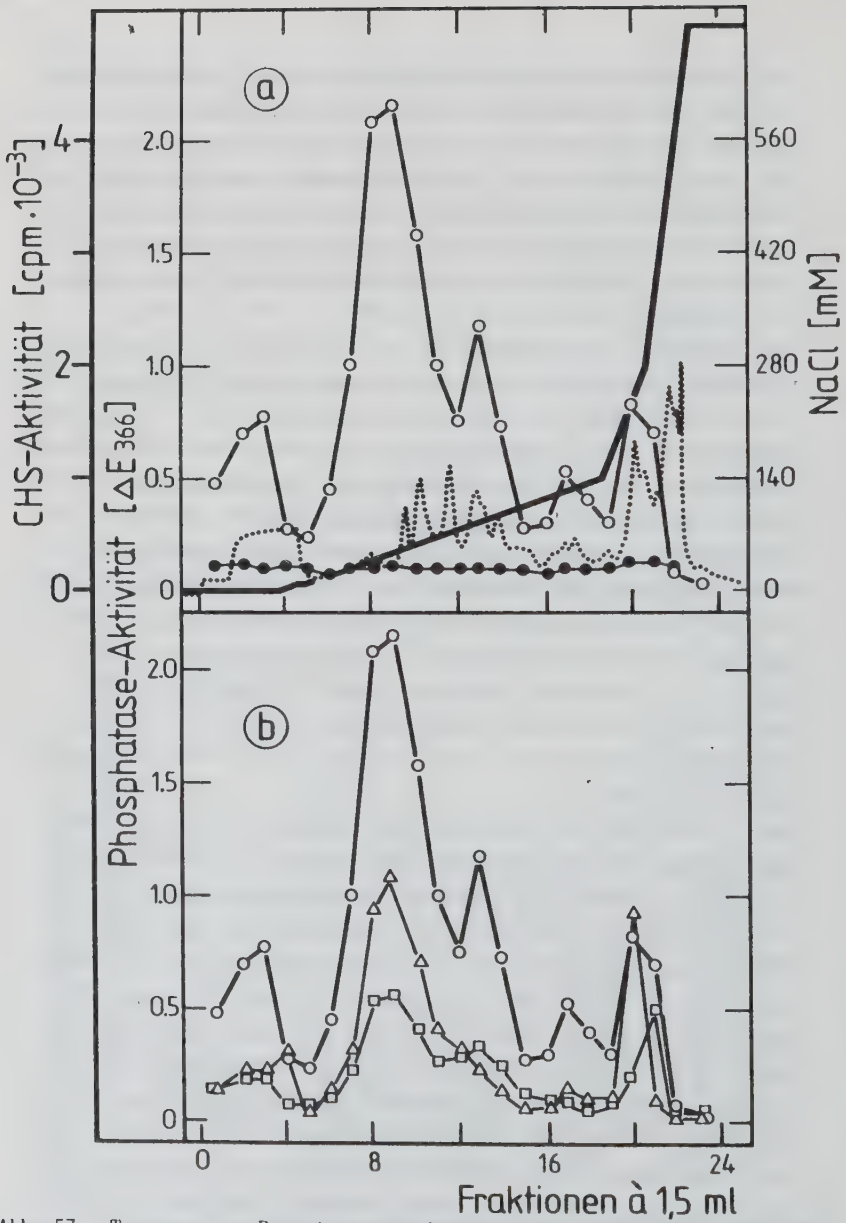


Abb. 57 Trennung von Protein aus anthocyanfreien Zellen auf der Mono-Q-Säule. a) ●——● CHS-Aktivität, o——o Phosphatase-Aktivität mit 3'-AMP als Substrat, —— NaCl, ····· OD 280 nm
b) Phosphatase-Aktivität mit verschiedenen Substraten getestet: 3'-AMP (O), 5'-AMP (□), Glucose 6-phosphat (△)

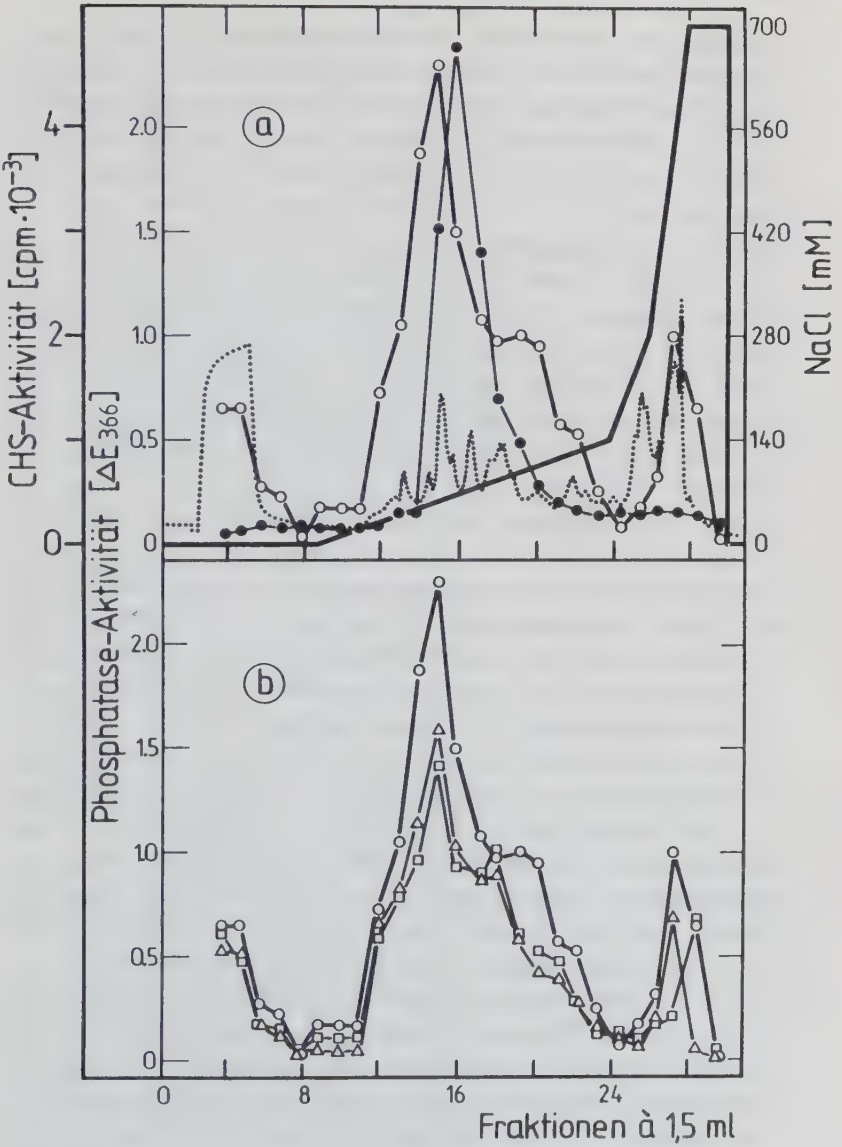


Abb. 58 Trennung von Protein aus anthocyanhaltigen Zellen auf der Mono Q-Säule. a) ●——● CHS-Aktivität, o——o Phosphatase-Aktivität mit 3'-AMP als Substrat, —— NaCl, ····· OD 280 nm
b) Phosphatase-Aktivität mit verschiedenen Substraten getestet: 3'-AMP (○), 5'-AMP (□), Glucose 6-phosphat (△)

verloren. Bei der Phosphatase-Aktivität mit 3'-AMP als Substrat sind wieder mehrere Aktivitäten getrennt worden (Abb. 58a). Die Hauptaktivität war nicht ganz getrennt von der CHS-Aktivität, die Maxima der beiden Aktivitäten lagen nur um eine Fraktion auseinander. Die Überlappung der Aktivitäten schließt es eigentlich aus, daß es sich bei der Haupt-Phosphatase-Aktivität um eine 3'-Nucleotidase (Hemmaktivität) handelt. Geht man davon aus, daß die Trennung etwas schlechter war, als in Abbildung 57a, sind die Elutionsprofile für die Phosphatase-Aktivitäten aus weißen und anthocyanhaltigen Zellen sehr ähnlich. Allerdings war die Substratspezifität gegenüber 3'-Phosphat mit Aktivitäten aus anthocyanhaltigen Zellen geringer (Abb. 58b).
Eine 3'-Nucleotidase konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Die beiden Zellinien zeigten keine wesentlichen Unterschiede im Verteilungsprofil der Phosphatase-Aktivitäten auf der Mono Q-Säule. Die Haupt-Phosphatase-Aktivität wurde dicht bei der CHS-Aktivität eluiert (anthocyanhaltige Zellen) und zeigte keine Hemmung im CHS-Test (anthocyanfreie Zellen). Vermutlich wurde diese, relativ unspezifische, Monophosphatase durch die CHS-Standardtestbedingungen (100 mM KPi; pH 8,0; 1,4 mM ME) gehemmt.

Der Ausfall der CHS-Aktivität in weißen Zellen kann aus den oben genannten Gründen nicht durch das gleichzeitige Vorhandensein einer in vitro störenden 3'-Nucleotidase erklärt werden. Die rasche Abnahme der CHS-Aktivität nach GA_3-Gabe, konnte ebensowenig auf ein gleichzeitiges Ansteigen einer 3'-Nucleotidase zurückgeführt werden (Mischexperimente). Die Reinigung einer 3'-Nucleotidase, die per definitionem spezifisch für 3'-Nucleotide ist, gelang nur mit dem Test auf Hemmaktivität und nicht mit dem üblichen Test, der auf der colorimetrischen Bestimmung von freigesetztem anorganischen Phosphat beruht und auch alle weniger spezifischen Monophosphatasen erfaßt.

Vergleicht man die Trennungen auf der Mono Q-Säule von Hemmaktivität (Abb. 48) und Phosphatase-Aktivitäten (Abb. 57b), so könnte es sich bei der Aktivität in Fraktion Nr. 13 (Abb. 57b) um die 3'-Nucleotidase handeln. Beide Aktivitäten wurden bei 70 mM NaCl eluiert.

5. Nachweis von CHS-Protein mit der PAP-Methode

Die Methode eignet sich gut zum halb-quantitativen Nachweis von CHS-Protein, also auch von möglicher inaktiver CHS, z.B. in Rohextrakten aus Blüten (RALL 1983).
Leider gab es mit dieser Methode beim Nachweis von CHS in Rohextrakten aus Kallus- und Suspensionskulturen aus *Daucus carota* einige Schwierigkeiten. Zum einen war mit den Extrakten die Färbung sehr schwach, zum andern traten auch zahlreiche Nebenbanden auf.
Dieses Phänomen der Nebenbanden wurde auch mit Kallus-Kulturen von *Matthiola incana* beobachtet (RALL 1983). Ein zuverlässiger Nachweis der CHS, um einen Vergleich von anthocyanhaltigen und anthocyanfreien Zellen durchführen zu können, war mit Rohextrakten aus Zellkulturen nicht möglich. Einen Vergleich der Extrakte aus Blüten der Wilden Möhre zeigt Abbildung 59. Als Kontrolle diente ein parallel aufgearbeiteter Extrakt aus Blüten von *Matthiola incana* (Abb. 59c). Hier gelang ein eindeutiger Nachweis der CHS-Untereinheit mit einem MG von ca. 43 000. In Extrakten aus violetten Zentralblüten der Möhre war viel weniger CHS vorhanden, eine schwache Färbung war bei MG=43 000 zu erkennen (Abb. 59b). Mit Extrakten aus weißen Karottenblüten trat keine Färbung auf. Hier war die CHS-Proteinmenge geringer und unter der Nachweisgrenze. Obwohl die CHS-Aktivität in violetten Zentralblüten sehr gut meßbar war, erhielt man mit der PAP-Methode nur eine schwache Färbung. Diese Methode erwies sich als relativ unempfindlich.

Abb. 59

Nachweis von CHS-Protein mit PAP-Methode (siehe II. 8.5.) in Rohextrakten verschiedener Blüten:
a) Wilde Möhre, weiße Randblüten
b) Wilde Möhre, violette Zentralblüten
c) *Matthiola incana*
Gezeigt werden die Nitrozellulosefilter nach der PAP-Farbreaktion. Miteingezeichnet wurden die Molekulargewichte von Eichproteinen, die bei der Elektrophorese mitaufgetrennt wurden

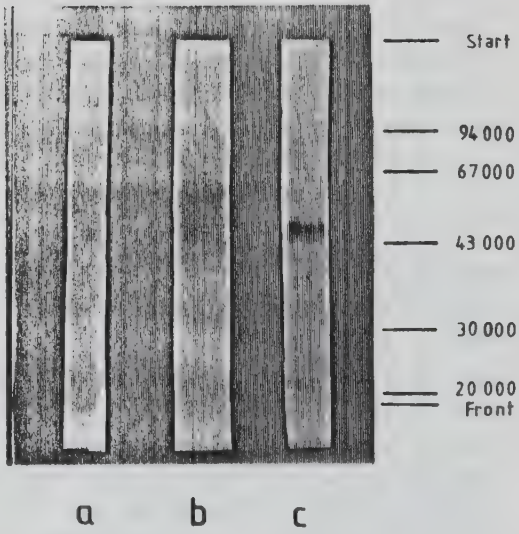
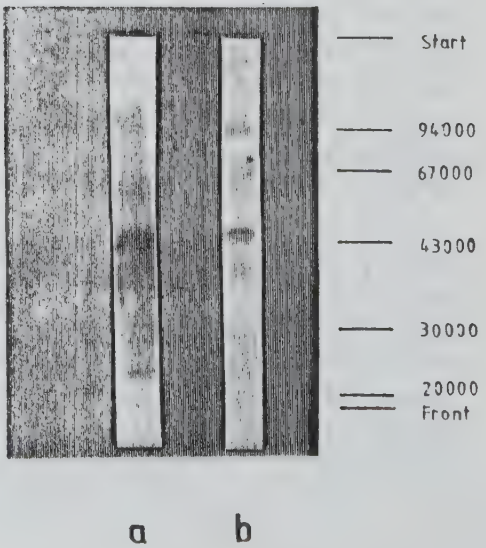


Abb. 60

Nachweis von CHS-Protein in partiell gereinigter CHS-Präparationen aus Suspensionszellen:
a) DEAE-Sephacel
b) Mono Q
Einzelheiten siehe Abb. 59



Der Nachweis von CHS-Protein aus Suspensionskulturen gelang mit partiell gereinigten CHS-Präparationen (Abb. 60). Die Reinigung mit DEAE-Sephacel als letztem Schritt steigerte die spezifische CHS-Aktivität 34,5 fach. Mit dieser Präparation ergab sich auch mit der PAP-Methode deutliche Färbung (60a). Allerdings traten neben der Hauptbande mit MG=43 000 (CHS-Untereinheit), auch zahlreiche Nebenbanden auf. Weniger Nebenbanden traten bei der CHS-Präparation auf, die über die Mono Q-Säule isoliert wurde (Abb. 60b).

Mit der Wilden Möhre wurde gezeigt, daß weiße Blüten (ohne meßbare CHS-Aktivität) kein nachweisbares CHS-Protein enthielten, im Gegensatz zu violetten Blüten, in denen CHS-Protein nachgewiesen wurde. Hier erfolgte die Regulation sehr wahrscheinlich über die Synthese des Enzyms. Ob auch im Falle der Regulation durch GA_3 eine Sistierung der CHS-Synthese erfolgt oder ob eine Inaktivierung des Enzyms die rasche Aktivitätsabnahme bewirkt, bedarf weiterer Klärung. In ungereinigten Extrakten aus Suspensionszellen war die CHS-Proteinmenge zu gering um eine quantitative Analyse der GA_3-Wirkung durchführen zu können. Die Expression der CHS in Kulturen von *Daucus carota* scheint äußerst gering zu sein. Dies würde auch gut zu der limitierenden Rolle der CHS für die Anthocyansynthese ("Flaschenhals-Enzym") passen. Der Nachweis von CHS-Protein gelang erst mit partiell gereinigten Präparaten. Für die CHS-Untereinheit wurde ein MG von 43 000 bestimmt.

6. Nachweis von CHS-Aktivität in Präparationen isolierter Vakuolen

Ein wesentlicher Gesichtspunkt für die Regulationsvorgänge bei der Synthese und Akkumulation von Sekundärstoffen ist die intrazelluläre Kompartimentierung der Teilprozesse. Innerhalb unserer Arbeitsgruppe werden seit geraumer Zeit anthocyanhaltige Vakuolen aus Suspensionszellen von *Daucus carota* isoliert, gereinigt und charakterisiert (HOPP et al. 1983).

Ausgehend von diesen Vakuolenpräparationen wurde das darin enthaltene Protein in partikuläres (membrangebundenes) und lösliches Protein getrennt. Verschiedene Konzentrierungsschritte waren nötig, um genügend Protein in die Enzymtests einbringen zu können. Eine in gleicher Weise aufgearbeitete Protoplastensuspension war erforderlich, um die Verteilung der Enzymaktivitäten kalkulieren zu können. Die Aufarbeitung gliederte sich in folgende Schritte:

1. Protoplasten / Vakuolen (Suspension)
2. Ultrafiltration, Homogenisation
3. Dowex-Behandlung
4. 100 000 g Sediment, resuspendiert
5. 100 000 g Überstand, Ammoniumsulfat-Präzipitation (0 - 85 %), Sephadex G-25, Ultrafiltration

Die verschiedenen Fraktionen wurden auf PAL-, CHS- und CHI-Aktivität getestet. PAL- und CHI-Aktivität konnte nur in den Fraktionen 3. und 5. aus Protoplasten signifikant gemessen werden. Diese Enzyme waren in sämtlichen Vakuolen-Fraktionen unter der Nachweisgrenze.

Die Verteilung der CHS-Aktivität zeigt Abbildung 61. Das Experiment mit den höchsten cpm-Werten wurde dargestellt. Die Kalkulation der Aktivität erfolgte auf der Basis der Naringenin-Werte, die bis auf Fraktion Nr. 4 der Vakuolen, alle deutlich über der Nachweisgrenze lagen. In Abbildung 61a wurde die CHS-Aktivität auf 10^6 Protoplasten bzw. Vakuolen normiert. In diesem Experiment wurde 74 % der CHS-Aktivität von Protoplasten in der Vakuolensuspension bestimmt. Im Laufe der verschiedenen Aufarbeitungsschritte nahm die Ausbeute an CHS-Aktivität auf Grund von Aktivitätsverlusten ab. Der Vergleich von Schritt 4. zu 5. läßt erkennen, daß die Hauptmenge der CHS-Aktivität im 100 000 g Überstand auftrat. Im Sediment mit Protoplasten wurde allerdings deutliche CHS-Aktivität festgestellt. Die Verteilung betrug 85 % im Überstand und 15 % im Sediment.

Der Verlauf der spezifischen Enzymaktivitäten ist in Abb. 61b dargestellt. Die Vakuolen-Fraktionen besaßen z.T.

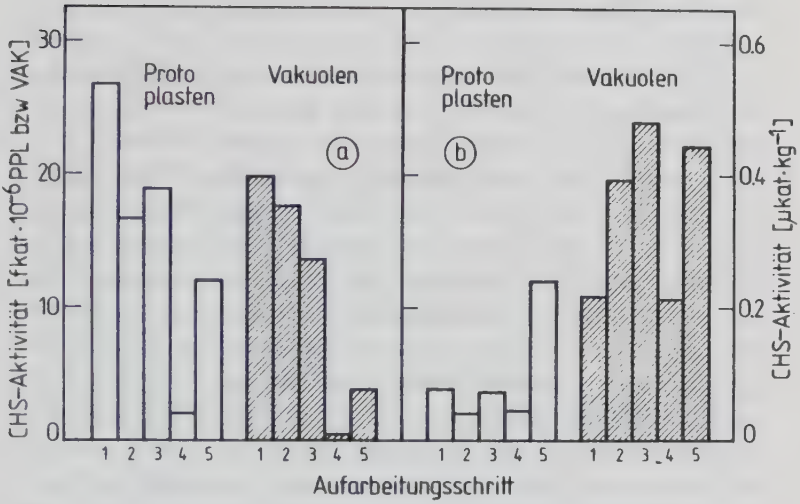


Abb. 61 CHS-Aktivität in verschiedenen Aufarbeitungsschritten mit Protoplasten (PPL) und isolierten Vakuolen (VAK) als Ausgangsmaterial
1) Protoplasten- bzw. Vakuolensuspension, 2) Ultrafiltration und Homogenisation, 3) Dowex-Behandlung, 4) 100 000 g Sediment, 5) 100 000 g Überstand
a) Aktivität pro 10^6 PPL bzw. VAK, b) spezif. Aktivität

mehrfach höhere spezifische CHS-Aktivitäten. In der Vakuolensuspension z.B. war sie 3,2 fach höher als in der Protoplastensuspension. Die relativ hohe spezifische CHS-Aktivität im 100 000 g Sediment von Vakuolen ist auf Grund zu geringer Radioaktivität von Naringenin (60 cpm über Nullzählung) nicht genügend abgesichert. Das Ansteigen der spezifischen CHS-Aktivität wurde begünstigt durch die geringen Proteingehalte der Vakuolen.
Die Versuche haben gezeigt, daß ein gewisser Teil der CHS-Aktivität nach der Homogenisation an Membranen gebunden bleibt (Protoplasten, 100 000 g Sediment). Dieselbe Beobachtung wurde auch mit der Standard-Zellaufarbeitung gemacht, dort befand sich im 25 000 g Sediment noch relativ

viel CHS-Aktivität. Der Hauptanteil der CHS-Aktivität trat aber immer im Überstand auf (nach Homogenisation).

Dies deutet darauf hin, daß die CHS in *Daucus carota* auch in vivo mit Membranen assoziiert ist. Partikuläre Aktivität wurde auch für CHS aus *Hippeastrum* nachgewiesen (HRAZDINA et al. 1978, WAGNER und HRAZDINA 1984). Durch Isolierung und Reinigung von Vakuolen aus lysierten Protoplasten wurde die CHS-Aktivität mit einer Ausbeute bis zu 74 % mitisoliert. In anderen Experimenten war die Ausbeute geringer (59% und 63%). Die Vakuolenpräparation war ein effektiver Reinigungsschritt für die CHS, die Steigerung der spezifischen Aktivität war 3,2 fach. Alle Befunde sprechen dafür, daß die CHS in vivo an die Vakuolenmembran gebunden ist. Allerdings ist diese Bindung relativ schwach, ein Teil der Aktivität löst sich bei den Vakuolen-Reinigungsschritten ab, dies erklärt die verminderten Ausbeuten von 59 - 74 %. Daraus muß wiederum geschlossen werden, daß die CHS an der cytoplasmatischen Seite des Tonoplasten lokalisiert ist. Nach Zerstörung und Homogenisation der Vakuolen bzw. Protoplasten, erscheint die CHS-Aktivität nahezu vollständig im Überstand.

Von den Enzymen PAL und CHI konnten weder partikuläre, noch in Vakuolenpräparationen enthaltene, Aktivitäten nachgewiesen werden. Diese Enzyme sind löslich bzw. schwach an Membranen assoziiert und aller Wahrscheinlichkeit nach im Cytoplasma lokalisiert.

IV DISKUSSION

1. Kompartimentierung des Anthocyanstoffwechsels

Das wichtigste Kompartiment der Pflanze für Speicherung von Sekundärstoffen ist die Zellsaftvakuole, in der Flavonoide und andere Phenylpropane als wasserlösliche Glycoside angehäuft werden. Ein Beispiel dafür sind die Anthocyane, die sehr häufig in den Zellsaftvakuolen der Epidermiszellen akkumulieren (Zusammenfassungen bei MATILE 1978, WIERMANN 1981).
Die Fähigkeit Anthocyane zu akkumulieren ist in Senf-Kotyledonen eng verknüpft mit der Differenzierung von Vakuolen (STEINITZ und BERGFELD 1977). Entsprechendes gilt auch für die Suspensionskulturen von *Daucus carota*. Die Anthocyanakkumulation erfolgte in der späteren Wachstumsphase, ein Zeitpunkt, der durch Vakuolisierung und Zellstreckung charakterisiert war.
Weitere Kompartimente für Speicherung von Flavonoiden und anderen Phenylpropanen sind die Zellwand (WIERMANN 1981, WIERMANN und VIETH 1983) und die Plastiden (CZICHI und KINDL 1975, McCLURE 1979, HRAZDINA et al. 1980). Die Akkumulation von Flavonoiden in Plastiden führte zu der Hypothese, daß in diesen Organellen die Flavonoid-Biosynthese stattfindet, mit einem Transport der Flavonoide aus den Plastiden in die Vakuolen wurde die dortige Akkumulation erklärt (McCLURE 1975). In vielen Fällen konnte aber gezeigt werden, daß die Enzyme der Flavonoid-Biosynthese nicht in Plastiden enthalten waren (HRAZDINA et al. 1980, FUISTING und WEISSENBÖCK 1980). Die Vorstellung, daß die Synthese der Flavonoide im Cytoplasma stattfindet hat weitgehend Anerkennung gefunden.
Nach FRITSCH und GRISEBACH (1975) soll die Anthocyansynthese teilweise oder vollständig an Membranen lokalisiert sein. Zwei Enzyme des Anthocyanstoffwechsels sind mikrosomale Enzymsysteme: Die Zimtsäure 4-Hydroxylase

(CAH) (RUSSELL und CONN 1967, CZICHI und KINDL 1977, SAUNDERS et al. 1977) und die Flavonoid 3'-Hydroxylase (FRITSCH und GRISEBACH 1975, FORKMANN et al. 1980, BRITSCH et al. 1981, SPRIBILLE und FORKMANN 1982a). Für die PAL wurde ebenfalls eine microsomal gebundene Aktivität gefunden (CZICHI und KINDL 1977). SAUNDERS et al. (1977) konnten die Lokalisation der CAH am ER nachweisen.

Da die Anthocyane in Vakuolen akkumulieren, wurde angenommen, daß späte Syntheseschritte in Vakuolen oder am Tonoplasten lokalisiert sind (FRITSCH und GRISEBACH 1975). Untersuchungen mit isolierten Vakuolen konnten aber weder CHS und CHI, noch die Anthocyanidin-Glucosyltransferase, die einen sehr späten Schritt der Anthocyansynthese katalysiert, in oder an Vakuolen nachweisen (HRAZDINA et al. 1978, WAGNER und HRAZDINA 1984). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen JONSSON et al. (1983), die die Lokalisation einer Anthocyan-Methyltransferase an und in Vakuolen ausschließen konnten.

Neueste Vorstellungen gehen davon aus, daß die gesamte Phenylpropanoid- und Flavonoid-Synthese am ER lokalisiert ist (WAGNER und HRAZDINA 1984). Selbst bei terminalen Schritten der Anthocyan-Biosynthese soll die Vakuole nicht beteiligt sein (JONSSON et al. 1983).

Die Lokalisation von CHS an der cytoplasmatischen Seite des Tonoplasten, mit Protoplasten aus *Daucus carota* Suspensionszellen, widersprechen diesen Vorstellungen. Zum ersten Mal wurde ein Enzym des Flavonoidstoffwechsels in Vakuolenpräparationen nachgewiesen. Man muß davon ausgehen, daß in *Daucus carota* die Vakuolenmembran den Ort der Flavonoid-Synthese darstellt.

Membrangebundene CHS-Aktivität wurde auch in *Hippeastrum* gefunden (HRAZDINA et al. 1978, WAGNER und HRAZDINA 1984), allerdings war keine Aktivität in Vakuolenfraktionen vorhanden. Daraus wurde dann eine Lokalisation der CHS am ER vermutet, ohne daß dieses Enzym dort bisher nachgewiesen werden konnte. Da die CHS mit den Membranen nur assoziiert ist, hängt der Nachweis in erster Linie von

den Isolationsbedingungen ab. Bei Homogenisation von Protoplasten mit einem Glas-Homogenisator erscheint 85 % des Enzyms als lösliche Aktivität. Hohe Osmolaritäten und Ionenstärken bei der Isolation von Vakuolen oder Scherkräfte bei anschließenden Zentrifugationsschritten könnten eine quantitative Ablösung der CHS von der Membran bewirken. Der mögliche Einwand, daß es sich bei der CHS-Aktivität an Vakuolen um einen Präparationsartefakt handelt, kann abgewehrt werden. Zwar waren die Vakuolenfraktionen mit ER (Cytochrom C-Reduktase) in geringem Maße kontaminiert (HOPP, persönliche Mitteilung) damit kann aber nicht die CHS-Aktivität von über 50 % in der Vakuolensuspension erklärt werden. Auch eine nachträgliche Bindung von ursprünglich löslicher bzw. vom ER solubilisierter CHS, wie es für die bereits erwähnte Anthocyan-Methyltransferase angenommen wurde (JONSSON et al. 1983), ist in dieser Größenordnung unwahrscheinlich. Eine unspezifische und doch nahezu selektive Bindung der CHS an den Tonoplasten während der Vakuolenpräparation ist unvorstellbar.

Zumindest in *Daucus carota* scheint es wahrscheinlich, daß der 2. Abschnitt der Anthocyansynthese, der Flavonoidstoffwechsel, an der cytoplasmatischen Seite der Vakuolenmembran lokalisiert ist, dies kommt der ursprünglichen Vorstellung von FRITSCH und GRISEBACH (1975) sehr nahe. Die Enzyme CHI und CGT (PETERSEN, persönliche Mitteilung) konnten nicht an Vakuolen nachgewiesen werden. Möglich wäre, daß diese "löslichen" Enzyme eine schwächere Membranaffinität als die CHS besitzen.

Eine Entscheidung, ob die Flavonoid-Biosynthese nun am ER oder am Tonoplasten stattfindet, könnte mit der Lokalisation der Flavonoid 3'-Hydroxylase getroffen werden. Dieses Enzym ist eindeutig membrangebunden (Mikrosomen) und auch in *Daucus carota* vorhanden.

Nicht auszuschließen wäre eine Kooperation von ER und Vakuole im Verlauf der Entwicklung. Im Zusammenhang mit

der Cytodifferentierung der Vakuolen könnte über einen Membranfluß eine Verlagerung von ursprünglich ER-gebundenen Enzymen Richtung Tonoplast erfolgen. Ein Zusammenwirken der beiden Kompartimente bei der Anthocyansynthese muß auf jeden Fall gefordert werden, denn die CAH und eventuell die anderen Schritte des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels sind am ER lokalisiert, während das Endprodukt in Vakuolen akkumuliert.
Weitere Aufschlüsse über die Rolle der Vakuole bei der Anthocyansynthese sollen Transportstudien mit Anthocyanen bzw. deren Vorstufen bringen.

2. Die Hydroxylierung des B-Rings von Cyanidin in *Daucus carota*

Das einzige nachweisbare Flavonoid in *Daucus carota* Gewebekulturen, das Cyanidin, besitzt zwei Hydroxylgruppen am B-Ring, eine in 4'und eine in 3'-Position. Die 4'-Hydroxylierung erfolgt auf der Zimtsäurestufe, ausgehend von t-Zimtsäure wird dabei 4-Cumarsäure gebildet. Das entsprechende Enzym, die CAH wurde in Kulturen von *Daucus carota* nachgewiesen (HEINZMANN 1976, NOÉ und SEITZ 1982). Bei der Hydroxylierung in 3'-Position gibt es zwei Möglichkeiten. Sie kann ebenfalls auf der Zimtsäurestufe erfolgen, dabei wird aus 4-Cumarsäure Kaffeesäure gebildet ("Zimtsäure-Start-Hypothese", HESS 1968), oder sie erfolgt auf der Flavonoidstufe, wobei entweder Naringenin zu Eriodictyol oder Dihydrokämpferol zu Dihydroquercetin hydroxyliert wird ("Substitutions-Hypothese", GRISEBACH und PATSCHKE 1961) (vgl. hierzu auch Abb. 2). Beide Möglichkeiten sind in Pflanzen realisiert worden.
In Kalluskulturen der Karotte konnte Kaffeesäure nachgewiesen werden (BRAUN und SEITZ 1975). Es muß also eine Zimtsäure 3-Hydroxylase vorhanden sein. Bei Tracer-Experimenten mit ^{14}C-Phe konnte nur Einbau in Kaffeesäure, aber nicht in 4-Cumarsäure gemessen werden. Daraus wurde geschlossen, daß 4-Cumarsäure rasch zu Kaffeesäure

hydroxyliert wird, welches die Vorstufe von Cyanidin darstellt (BRAUN und SEITZ 1975).
Erste Untersuchungen mit der CHS aus Kalluskulturen zeigten, daß Caffeoyl-CoA in vitro als Substrat akzeptiert wurde, als Produkt konnte Eriodictyol nachgewiesen werden (HINDERER 1982). Es wurde vermutet, daß diese Reaktion auch in vivo eine Rolle spielen könnte.
Die Ergebnisse dieser Arbeit haben nun eindeutig gezeigt, daß das natürliche Substrat der CHS 4-Cumaroyl-CoA ist und die 3'-Hydroxylierung auf der Flavonoidstufe erfolgt. Die genauere Analyse der Substratspezifität von partiell gereinigter CHS ergab eine sehr hohe Spezifität für 4-Cumaroyl-CoA. Der K_m-Wert für Caffeoyl-CoA war um eine Größenordnung höher als für 4-Cumaroyl-CoA. Entsprechendes galt für die Hemmung durch Chalcon und Flavanon. Mit dem Auftreten der zweiten Hydroxylgruppe in 3'-Position des B-Rings ging ein großer Teil der Hemmaktivität verloren, dies betrifft auch die Reaktion mit Caffeoyl-CoA als Substrat. Auch die CHI hatte vermutlich eine höhere Affinität zu Naringeninchalcon. Dieses Enzym hatte mit Eriodictyolchalcon als Substrat deutlich geringere Aktivitäten (HINDERER, unveröffentlicht).
Die Supplementationsexperimente hatten gezeigt, daß Naringenin eine Vorstufe von Cyanidin war. Es mußte also eine 3'-Hydroxylierung auf der Flavonoidstufe erfolt sein. In *Daucus carota* Suspensionskulturen ist Naringeninchalcon das erste C_{15}-Produkt, von dem ausgehend die Synthese von Cyanidin-Glycosiden erfolgt. Die zurückliegenden Fütterungsexperimente von BRAUN und SEITZ (1975) müssen nun dahingehend interpretiert werden, daß 4-Cumarsäure über 4-Cumaroyl-CoA rasch in den Flavonoidstoffwechsel eingeschleust wurde, Kaffeesäure dagegen nicht. Die CCL aus DC_b-Kallus bevorzugte dabei 4-Cumarsäure (HEINZMANN et al. 1977, RAMMENSEE 1981). Erst wenn die CHS-Reaktion durch GA_3 blockiert war (DC_w-Kallus), erfolgte Einbau in Chlorogensäure und Ferulasäure (BRAUN und SEITZ 1975). Die CCL hatte in diesem Fall eine höhere Sepzifität für

Kaffeesäure, was durch die Existenz verschiedener Isoenzyme erklärt wurde (HEINZMANN et al. 1977).
Man darf nicht vergessen, daß der gesamte Hydroxyzimtsäure-Weg bis zur Sinapinsäure (vgl. Abb. 2) auch für die Anthocyansynthese in *Daucus carota* von Bedeutung ist, denn das Anthocyan liegt hauptsächlich als mit Sinapinsäure acylierte Form vor (HARBORNE 1983).

3. In vitro-Eigenschaften der CHS aus *Daucus carota*

Die Charakterisierung der partiell gereinigten CHS aus *Daucus carota* ergab einige neue Gesichtspunkte, die zum Verständnis der relativ komplexen CHS-Reaktion beitragen können. Die meisten Eigenschaften stimmten mit der CHS aus Petersilie überein: Das MG der Untereinheit, die verschiedenen pH-Optima und K_m-Werte für die beiden Cinnamoyl-CoA-Substrate, die verstärkte Nebenproduktbildung unter Einfluß von ME oder mit Caffeoyl-CoA als Substrat, sowie die Hemmung mit Naringenin, Naringeninchalcon, Acetyl-CoA und CoA-SH (KREUZALER und HAHLBROCK 1975a und b,HRAZDINA et al 1976, SALEH et al. 1978, KREUZALER et al. 1979).
Allerdings unterscheiden sich die Synthasen aus Karotte und Petersilie in zwei Eigenschaften: Die CHS der Karotte hatte mit 3 µM eine erheblich kleinere K_m für Malonyl-CoA als das Enzym aus Petersilie mit 35 µM. Auch die K_m für 4-Cumaroyl-CoA (0,6 µM) war kleiner als die von Petersilie-CHS (1,6 µM) (HRAZDINA et al. 1976). Der zweite Unterschied war der, daß die CHS aus *Daucus carota* durch Pantethein (bis 100 µM) nicht gehemmt wurde. Das Enzym aus Petersilie wurde dagegen durch Pantethein gleich stark gehemmt wie durch CoA-SH (KREUZALER und HAHLBROCK 1975b). Die CHS aus *Daucus carota* Suspensionszellen, Kalluszellen und Blüten stimmen hinsichtlich Substratverhalten grundsätzlich überein. Eine umfangreiche Charakterisierung wurde aber nur mit teilweise gereinigter CHS

aus Suspensionszellen durchgeführt.
In den meisten Fällen wurde CHS in Gegenwart von ME und Phosphat bei schwach alkalischen Bedingungen gereinigt (KREUZALER und HAHLBROCK 1975b, SALEH et al. 1978, HELLER und HAHLBROCK 1979, WHITEHEAD und DIXON 1983). Unter diesen Bedingungen war die CHS aus *Daucus carota* extrem instabil. Durch Entzug von ME und Herabsetzen des pH-Werts auf 6,5 konnte die Stabilität beträchtlich verbessert werden. Bis-Tris erwies sich dabei als hervorragend geeignete Puffersubstanz. Auch die Konzentrierung der Proben durch Ultrafiltration verbesserte die Stabilität des Enzyms, vor allem im Hinblick auf die Lagerung. Ähnliches wurde auch von der CHS aus Petersilie berichtet (SCHRÖDER et al. 1979a). Die zusätzliche Stabilisierung im Test mit ME und BSA schuf sehr günstige Bedingungen für die CHS-Reaktion. Dabei erwies sich BSA als besonders geeignetes Hilfsmittel, denn im Gegensatz zu ME förderte es nicht die Nebenprodukt-Bildung. Selbst bei hohen BSA-Mengen im Test, wurde die CHS-Reaktion nicht gestört. Die Aktivität der Blüten-CHS konnte nur in Gegenwart von BSA gemessen werden. BSA verhielt sich wie ein Cofaktor. Über stabilisierende Wirkung von BSA wurde zwar verschiedentlich berichtet (SALEH et al. 1978, SCHRÖDER et al. 1979a) aber genauer untersucht wurde dieser Effekt bisher nicht.

Die Wirkungen von BSA und ME waren vollkommen synergistisch und beeinflußten sich gegenseitig nicht. Die partiell gereinigte CHS zeigte unter diesen Bedingungen ein ideales Verhalten in Bezug auf Protein- und Zeitlinearität der Reaktion, dies zeigte auch, daß die beiden CHS-Substrate in Sättigungskonzentrationen vorlagen, eine selten erfüllte Bedingung bei Testansätzen für CHS.
In gleicher Weise wie die CHS spezifisch für 4-Cumaroyl-CoA war, besaßen auch Naringenin bzw. das isomere Chalcon, die den gleichen B-Ring wie 4-Cumaroyl-CoA aufweisen, größte Hemmaktivität unter den getesteten Phenylpropanen. Dies galt sowohl für die Reaktion zum Naringenin als auch für die Reaktion zum Eriodictyol. Es könnte vermutet

werden, daß diese Hemmung die Bindungsstelle für 4-Cumaroyl-CoA betrifft, die ja eine Spezifität für den B-Ring besitzt. Der Mechanismus der Hemmung von Naringenin wurde als unkompetitiv bestimmt (mit 4-Cumaroyl-CoA als variables Substrat). Dies deutet eher darauf hin, daß Naringenin auf den späteren Reaktionsverlauf einwirkt und möglicherweise einen Zwischenschritt hemmt, dies würde auch erklären, warum z.B. mit 4-Cumarsäure keine Hemmung auftrat. Um Hemmaktivität besitzen zu können, braucht das Molekül den B-Ring mit der Hydroxyl-Gruppe in Parastellung und Teile des A-Rings bzw. des Heterozykluses.
Die hohe Spezifität der CHS für den B-Ring des Startermoleküls steht in starkem Widerspruch zu der Entdeckung, daß die CHS aus Petersilie auch aliphatische CoA-Thioester als Substrate akzeptiert und die entsprechenden Phloroglucinol-Derivate formt (SCHÜTZ et al. 1983). Vielleicht binden diese aliphatischen Substrate gar nicht an die Bindungsstelle für 4-Cumaroyl-CoA sondern an die Stelle eines Intermediärprodukts. Auch die CHS aus *Daucus carota* hatte allein mit Malonyl-CoA als Substrat, ohne Cinnamoyl-CoA, Ethylacetat-lösliche Produkte gebildet, die nicht identifiziert wurden.
Ein wichtiger Aspekt zum Verständnis der CHS-Reaktion wurde durch die Hemmung mit 3'-Nucleotidase offenbart. Es konnte gezeigt werden, daß die 3'-Phosphatgruppe von Malonyl-CoA essentiell für die CHS-Reaktion war. Nach Dephosphorilierung war das Substrat nicht nur inaktiv, sondern besaß darüber hinaus starke Hemmaktivität. Mit 50 % Hemmung bei 3 µM war 3'-DP-Malonyl-CoA der wirksamste Inhibitor aller getesteten Substanzen. Daraus muß geschlossen werden, daß die Bindung an das Enzym noch in gleicher Weise stattfindet. Die Bindungsstelle(n) für Malonyl-CoA hat (haben) keine Spezifität für die 3'-Phosphatgruppe. Trotzdem ist die Reaktion zum Naringenin und auch zu den Nebenprodukten (Ethylacetat-lösliche) blockiert. Die Phosphat-Gruppe des CoA-Restes von Malonyl-CoA muß bei einem Intermediärschritt eine Rolle spielen.

Vielleicht ist sie bei den Translokationsschritten von Bedeutung. Für die CHS konnte kein Pantethenyl-Rest nachgewiesen werden, der bei der analogen Fettsäure-Biosynthese, entweder als gebundener Bestandteil des Enzyms oder als Acyl-carrier-protein (ACP), bei der Translokation beteiligt ist (BLOCH und VANCE 1977). Es ist vorstellbar, daß der CoA-Teil von Malonyl-CoA bei der CHS-Reaktion eine ähnliche Funktion besitzt, die terminale Phosphat-Gruppe könnte dann eine ionische Wechselwirkung mit einer positiv geladenen Enzymbindungsstelle eingehen. Der CoA-Teil von Malonyl-CoA wird erst relativ spät freigesetzt (vgl. Abb. 4). Das postulierte Acetyl-Carbanion reagiert als CoA-Ester und nicht in Enzym-gebundener Form (KREUZALER et al. 1978). Die Abspaltung von CoA erfolgt also sehr wahrscheinlich nach der Translokation.
Der Verlust der Hemmaktivität von CoA-SH nach Dephosphorilierung, kann nur so erklärt werden, daß CoA-SH und wahrscheinlich auch Acetyl-CoA auf den Intermediärschritt hemmend wirken, für den die 3'-Pi-Gruppe essentiell ist. Es tritt also keine Konkurrenz von CoA-SH mit Malonyl-CoA um die Substratbindungsstelle ein.
Um besser argumentieren zu können müßte in weiteren Experimenten die Art der Hemmung von 3'-DP-Malonyl-CoA, Acetyl-CoA und CoA-SH untersucht werden. Wichtig zu wissen wäre auch, ob mit 3'-DP-Malonyl-CoA eine Decarboxilierung und ein CO_2-Austausch noch stattfinden kann.
Bei der Einschleusung des Startermoleküls 4-Cumaroyl-CoA in die CHS-Reaktion, spielt die 3'-Pi-Gruppe dagegen keine Rolle. Neben 3'-DP-4-Cumaroyl-CoA wurde sogar 4-Cumaroyl-4'-Phosphopantethein als Substrat akzeptiert.

4. Die Regulation der CHS in *Daucus carota*

Der größte Teil dieser Arbeit befaßte sich mit der Untersuchung der GA_3-Wirkung auf die CHS-Aktivität und die damit möglicherweise verknüpfte Hemmung in Mischexperimenten. Die meisten bisherigen Erkenntnisse über die Hem-

mung der Anthocyansynthese durch GA_3 wurden durch Vergleich von zwei Kallus-Zellinien (DC_b, DC_w), die inzwischen seit mehr als 10 Jahren getrennt kultiviert werden (mit und ohne GA_3), gewonnen. Um genetische Veränderungen ausschließen zu können und um die Umsteuerung des Stoffwechsels zu untersuchen, wurden sämtliche Versuche zur GA_3-Wirkung mit Suspensionskulturen durchgeführt, die einmalig GA_3 erhielten. Die Hemmung der Anthocyansynthese durch GA_3, konnte so eindeutig auf die Hemmung der CHS zurückgeführt werden, die rasch, empfindlich und dosisabhängig auf GA_3 reagierte. Nicht nur bei der GA_3-Wirkung war die CHS die limitierende Aktivität für die Anthocyansynthese. Das Nachlassen der FähigKeit zur Anthocyansynthese bei älteren Suspensionskulturen, ging einher mit reduzierter CHS-Aktivität. Stark Anthocyan-produzierende Kulturen hatten immer eine hohe CHS-Aktivität. Die CHS-Reaktion stellt vermutlich ein "Nadelöhr" für die Anthocyan-Biosynthese dar.
Die Enzyme PAL und CHI wurden ebenfalls durch GA_3 gehemmt, aber niemals unter ein bestimmtes Niveau (40 %). Die CGT, ein relativ terminales Enzym der Anthocyansynthese, wurde nicht durch GA_3 gehemmt (HINDERER et al. 1984). Durch Supplementation mit Naringenin, Eriodictyol und Dihydroquercetin konnte die Aktivität der Folgeenzyme der CHI unter GA_3 demonstriert werden. Kurzfristig erzeugte GA_3 einen pyhsiologischen Block der Anthocyansynthese auf dem Niveau der CHS, analog einer Defektmutante. Bei Dauergabe von GA_3 (DC_w-Kallus) sind vermutlich weitere Enzymaktivitäten der Gruppe II stark reduziert, wie es für die CHI gezeigt werden konnte (HINDERER 1982).

Erfolgt die rasche Abnahme der CHS-Aktivität nach Zugabe von GA_3 durch Inaktivierung des Enzyms ?

Seit die Hemmung in Mischexperimenten nachgewiesen wurde, dachte man an die Möglichkeit einer posttranslationalen Regulation der CHS. Untersuchungen, auf der Basis von Mischexperimenten, mit ungereinigten Extrakten aus Kalluskulturen, führten zu der Vorstellung, daß GA_3 ein Protein

induziert, welches spezifisch die CHS inaktiviert (HINDERER 1982). SCHRÖDER und SCHÄFER (1980) hatten zuvor gezeigt, daß die CHS aus Petersilie mit einer Halbwertszeit von 6 h in eine inaktive Form übergeht, während das CHS-Protein mit einer Halbwertszeit von 18 h abgebaut wurde. Über den Mechanismus der Inaktivierung war nichts bekannt; es handelte sich aber wahrscheinlich um einen irreversiblen Vorgang (SCHRÖDER und SCHÄFER 1980). Der "Inhibitor" wurde jetzt als 3'-Nucleotidase identifiziert und der Hemmechanismus aufgeklärt. Diese Hemmung hat nichts mit einer Inaktivierung des Enzyms zu tun. Die Hemmung wird einzig und allein durch die Dephosphorilierung von Malonyl-CoA verursacht. Die Hemmung tritt nur auf, wenn beide Enzyme (CHS und 3'-Nucleotidase) gemeinsam im Test vorliegen. Auch eine Inaktivierung der CHS durch 3'-DP-Malonyl-CoA ist auszuschließen, denn die Hemmung war in vitro reversibel und es ist anzunehmen, daß dies auch in vivo der Fall wäre. Die Abnahme der CHS-Aktivität durch Inaktivierung, ist auf Grund der neuen Erkenntnisse unwahrscheinlich.

Kommt die Abnahme der CHS-Aktivität durch die gleichzeitige Zunahme einer 3'-Nucleotidase-Aktivität zustande ?

Man könnte sich vorstellen, daß GA_3 die 3'-Nucleotidase induziert, in vivo wäre die CHS-Reaktion blockiert und im CHS-Test würden geringere CHS-Aktivitäten gemessen werden, je nach Aktivität der 3'-Nucleotidase. In vitro konnte Hemmung nur mit Extrakten aus GA_3-Dauerkulturen ($DC_{w,\ wl}$) festgestellt werden. Nach einmaliger GA_3-Gabe besaßen die Extrakte keine eindeutige Hemmaktivität, allerdings auch kein additives Verhalten. Ferner konnte keine Induktion einer 3'-Nucleotidase durch GA_3 nachgewiesen werden, allerdings mit der Einschränkung, daß andere Phosphatasen stören könnten. Ein Vergleich der beiden Zellinien (mit und ohne GA_3 kultiviert) ergab keine qualitativen Unterschiede bei den Elutionsprofilen der Phosphatase-Aktivitäten auf der Mono Q-Säule. Ebensowenig konnte mit GA_3-behandelten Zellen eine CHS-Aktivität, nach Trennung auf

der DEAE-Sephacel-Säule oder auf der Mono Q-Säule nachgewiesen werden. Die Mono Q-Fraktionen in denen die CHS-Aktivität bei anthocyanhaltigen Kulturen auftrat, hatten bei den anthocyanfreien Kulturen (GA_3) weder CHS-Aktivität noch Hemmwirkung, noch eine 3'-Nucleotidase-Aktivität. Das Fehlen der CHS-Aktivität war also kein Trennproblem der beiden Enzyme CHS und 3'-Nucleotidase. Die CHS-Aktivität wird nicht indirekt über eine 3'-Nucleotidase-Aktivität reguliert.

Erfolgt die Regulation der CHS-Aktivität über die Steuerung der Synthese des Enzyms ?

Sehr gut untersucht wurde die Induktion der CHS-Aktivität durch UV-Licht in Petersilie-Suspensionskulturen. Dabei wurde festgestellt, daß mit der Aktivität auch die CHS-Proteinmenge anstieg (SCHRÖDER und SCHÄFER 1980). Die Induktion erfolgte durch de novo-Synthese und nicht durch Aktivierung von inaktivem Enzym. Für die CHS-Aktivität wurde eine sehr kurze Halbwertszeit von 6 h ermittelt. Da die Abbaurate für das Enzym konstant ist (HAHLBROCK 1981), kann eine effektive Regulation der CHS-Aktivität über die Synthese von Enzym erfolgen. Der Zunahme der CHS-Aktivität geht eine Zunahme der m-RNA-Aktivität voraus (SCHRÖDER et al. 1979b). Die Zunahme der m-RNA-Aktivität kommt durch Neusynthese zustande und nicht durch Aktivierung (KREUZALER et al. 1983). Die Induktion der CHS erfolgt aller Wahrscheinlichkeit nach durch die Erhöhung der Transkriptionsrate für die m-RNA, also durch Genaktivierung.
Ähnlich gut untersuchte Systeme sind die Elicitor-bedingten Induktionen der CHS in Suspensionskulturen von *Phaseolus vulgaris* (LAWTON et al 1983b) und *Glycine max* (HILLE et al. 1982). In beiden Fällen wurde auch Induktion der m-RNA nachgewiesen (LAWTON et al. 1983a, BELL et al. 1984, EBEL et al. 1984, SCHMELZER et al. 1984).
Es gibt noch eine Reihe weiterer Beispiele für Induktionen von CHS, die aber nicht so ausführlich charakterisiert wurden.

Begünstigt durch die kurze Halbwertszeit der CHS und unter der Annahme einer konstanten Abbaurate, kann eine sehr effektive Regulation über die Syntheserate des Enzyms bzw. der m-RNA erfolgen. Dies haben die beiden erwähnten Beispiele gezeigt.

Unter der Annahme, daß GA_3 eine Sistierung der Synthese von CHS in *Daucus carota* Suspensionskulturen bewirkt, wurde versucht, mit Hilfe der PAP-Methode quantitative Unterschiede in der CHS-Proteinmenge, nach GA_3-Behandlung, zu bestimmen. Die Methode erwies sich dafür als nicht geeignet. CHS-Protein konnte erst nach partieller Reinigung gut nachgewiesen werden. Eine gegen Ende dieser Arbeit angewandte, alternative Methode (in vivo-Markierung der CHS mit ^{35}S-Methionin, Immunpräzipitation, SDS-PAGE, Autoradiographie) brachte ebenfalls keine eindeutigen Resultate. Die CHS-Menge in *Dacucus carota* Kulturen ist sehr gering und konnte mit den gängigen Methoden kaum nachgewiesen werden. Trotzdem sind weitere Versuche in dieser Richtung sinnvoll, z.B. könnte die Radioaktivität bei der in vivo-Markierung noch um ein Vielfaches gesteigert werden. Eine Entscheidung, ob GA_3 nun die CHS-Synthese drosselt oder ob eine posttranslationale Regulation über Inaktivierung oder durch erhöhten Abbau erfolgt, konnte nicht getroffen werden.

Bei Blüten der Karotte konnten mit Hilfe der PAP-Methode quantitative Unterschiede in der CHS-Proteinmenge zwischen violetten und weißen Blüten festgestellt werden. Die weißen Blüten enthalten demnach keine inaktive CHS.

Eine vergleichbare Differenzierung wie in der Dolde der Wilden Möhre, zeigt sich bei einer Mutante von *Petunia hybrida* (Red Star). In Abhängigkeit von der Belichtung werden bei der Blütenentwicklung weiße, anthocyanfreie Sektoren innerhalb der sonst roten, anthocyanhaltigen Petalen gebildet. MOL et al. (1983) konnten zeigen, daß dieses Muster durch unterschiedliche Expression der CHS zustande kommt. In weißen Sektoren wurde weder CHS noch deren m-RNA nachgewiesen. Andere Enzyme der Gruppe II

waren vorhanden, aber mit reduzierten Aktivitäten. In roten Sektoren war die CHS dagegen aktiv.
Die Differenzierung in pigmentierte und Pigment-freie Zellen kann über die Genexpression eines einzigen Enzyms gesteuert werden. Das Eingangsenzym des Flavonoid-Glycosid-Stoffwechsels ist auch für die Karotte die entscheidende Regulationsstelle. Die CHS kann zurecht als Schlüsselenzym bezeichnet werden.

Erfolgt eine koordinierte Regulation von CHS und PAL ?

Bei der Induktion der CHS durch UV in Petersilie Suspensionskulturen, erfolgt eine gemeinsame Induktion aller Enzyme der Gruppe I und II. Dagegen wurden bei Verdünnung und Elicitorenbehandlung nur die Enzyme der Gruppe I (PAL, CAH, CCL) selektiv induziert (HELLER 1981). Den Enzyminduktionen gehen Induktionen der jeweiligen m-RNAs voraus (HAHLBROCK 1981). In Petersilie Zellkuluren werden die beiden Gruppen getrennt reguliert, aber innerhalb der Gruppen erfolgt eine koordinierte Regulation. PAL und CHS werden also in diesem System unabhängig voneinander reguliert. Bei der Elicitor-Induktion der CHS in Zellkulturen von *Phaseolus vulgaris* (LAWTON et al. 1983b) und *Glycine max* (HILLE et al. 1982) wurden CHS, PAL und andere Enzyme, im Zusammenhang mit Phytoalexinsynthese, gemeinsam induziert. Solche Induktionen erfolgen nicht nur in Zellkulturen. In Erbsenkeimlingen wurden PAL, CHS und andere Enzyme des Flavonoidstoffwechsels durch Licht induziert (HRAZDINA und PARSONS 1982). Es ist kein Fall bekannt, in dem eine Induktion der CHS ohne gleichzeitige Induktion der PAL auftrat. In Kulturen von *Daucus carota* wurde bisher keine Induktion der CHS beobachtet. Der Anstieg der CHS-Aktivität im Verlauf des Kulturalters war begleitet von einem Anstieg der PAL-Aktivität. Durch GA_3 wurden beide Enzyme gehemmt, dabei konnte die CHS-Aktivität vollständig eliminiert werden, während die PAL-Aktivität nicht unter ein bestimmtes Niveau absank. Selbst in der mit GA_3 dauerkultivierten Zellinie (DC_w) sind PAL und andere Enzyme des

allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels vorhanden. Diese Kultur besitzt z.B. die Fähigkeit zur Chlorogensäure-Synthese (BRAUN und SEITZ 1975).
Bei Induktion der PAL durch L-AOPP und Ca^{2+}-Ionophor wurde die CHS-Aktivität nicht induziert sondern reduziert. Auch bei durch Infektion gesteigerter PAL-Aktivität, war die CHS-Aktivität stark abgesunken (eigene Beobachtung).
Die Reduzierung der PAL-Aktivität (und anderer Enzyme der Gruppe I) durch GA_3, könnte eine Folge des blockierten Flavonoid-Stoffwechsels sein. Da GA_3 eindeutig die CHS-Aktivität am empfindlichsten und schnellsten gehemmt hatte, könnte dies zu einem Rückstau der Chalcon-Vorstufen führen. Falls eine Feedback-Regulation der PAL-Synthese durch Zimtsäure erfolgt, würde die PAL-Aktivität absinken. Eine solche Kontrolle der PAL-Synthese durch Zimtsäure wurde z.B. für PAL aus Kartoffel nachgewiesen (LAMB 1977, SHIRSAT und NAIR 1981). Eine Regulation der PAL durch Zimtsäure würde auch die Superinduktion der PAL durch L-AOPP, die auf Neusynthese beruht (NOÉ und SEITZ 1982), erklären. Da L-AOPP die PAL hemmt, findet keine Zimtsäure-Synthese mehr statt und die PAL-Synthese gerät außer Kontrolle (JONES 1984). Eine Regulation der PAL durch ihr Substrat Phenylalanin spielt dagegen in *Daucus carota* Zellkulturen keine Rolle (NOÉ 1982). Dies wird unterstützt durch die Aminosäureanalysen, die auch im Falle der GA_3-Wirkung einen leicht erhöhten Phe-Gehalt gezeigt hatten, bei reduzierter PAL-Aktivität. Daß die Phe-Gehalte der Zellen unter GA_3 erst relativ spät zunahmen (12 d) und anfangs sogar abgenommen hatten (10 d), spricht ebenfalls für eine Feedback-Hemmung der PAL-Aktivität durch Flavonoid-Vorstufen (Zimtsäuren).
Durch L-AOPP wurde der Phenylpropan-Stoffwechsel blockiert, dies konnte durch den 3 fachen Gehalt an freiem Phenylalanin gezeigt werden. NOÉ und SEIZ (1982) hatten gezeigt, daß L-AOPP selektiv die PAL induzierte, andere Enzyme der Gruppe I wurden nicht beeinflußt. Vermutlich werden alle Enzyme der Gruppe I nicht über Substrate reguliert. Unter-

suchungen mit der CHS ergaben nun, daß die Aktivität nach L-AOPP-Gabe stark reduziert wurde. Hier sind zwei verschiedene Erklärungen möglich:

1. Die CHS wird durch ihr Substrat 4-Cumaroyl-CoA reguliert. Durch L-AOPP ist die Synthese von 4-Cumaroyl-CoA blockiert. Die Synthese der CHS wird nicht mehr stimuliert. Es kommt rasch zu einem Abfall der CHS-Aktivität.

Gegen diese Möglichkeit spricht, daß im Falle einer Induktion der Gruppe I-Enzyme, z.B. durch Verdünnung oder Infektion, die CHS-Aktivität nicht gesteigert wurde. Dagegen spricht auch, daß bei längerer Einwirkung von L-AOPP die CHS-Aktivität wieder ansteigt.

2. Es erfolgt eine koordinierte Regulation in der Weise, daß bei PAL-Induktion gleichzeitig die CHS-Synthese gestoppt wird.

Dies war vermutlich bei der Induktion der PAL durch L-AOPP, Ca^{2+}-Ionophor, Verdünnung und Infektion der Fall. Diese Art der Regulation erinnert an die selektive Induktion der Gruppe I-Enzyme der Petersilie durch Elicitoren. Eine solche Regulation wäre sinnvoll, wenn innerhalb des Phenylpropanstoffwechechsels eine Umschaltung von Flavonoid-Synthese auf die Synthese anderer Phenole erfolgen soll, z.B. die Synthese von Phytoalexinen. In Karotten wurden mehrere Substanzen nachgewiesen, die nach Pilzinfektion gebildet wurden und starke wachstumshemmende Wirkung auf Pilze und andere Mikroorganismen besaßen. Die bekannteste Substanz ist das 6-Methoxymellein (KUROSAKI und NISHI 1983), ein echtes Phytoalexin, das sich vom Terpenoid-Stoffwechsel ableitet. Darunter war aber auch die p-Hydroxybenzoesäure (HARDING und HEALE 1980), eine Substanz aus dem allgemeinen Phenylpropan-Stoffwechsel.

Beim gegenwärtigen Stand der Untersuchungen bleibt noch völlig ungeklärt, in welche Richtung eine Umsteuerung des Sekundärstoffwechsels in *Daucus carota* erfolgt.

Werden die Enzyme der Gruppe II in Daucus carota koordiniert reguliert ?

Als einziges weiteres Enzym der Gruppe II, neben der CHS, wurde die CHI-Aktivität untersucht. Dieses Enzym reagierte in gleicher Weise wie die CHS. Der Kulturalterverlauf der beiden Enzyme war ähnlich. In Fällen, in denen die CHS gehemmt wurde, war auch die CHI gehemmt. Mit dem Unterschied, daß die Hemmung nicht so stark war, wie für die CHS. Dies war besonders bei den Experimenten der Fall, bei denen GA_3 erst in der Mitte der Kulturperiode zugegeben wurde. Ähnlich wie die PAL wurde dieses Enzym durch GA_3 nicht unter ein bestimmtes Niveau gehemmt.

Der Verlauf der CHI-Aktivität nach Gabe von L-AOPP war sehr aufschlußreich. Während die CHS-Aktivität bereits nach 12 h um 75 % gehemmt war, zeigte sich bei der CHI erst nach 4 d eine deutliche Hemmung. Dies könnte bedeuten, daß die CHI-Aktivität über das Substratangebot reguliert wird. Ob die anderen Enzyme in gleicher Weise reguliert werden ist nicht bekannt. Die CGT wurde durch GA_3 nicht gehemmt (HINDERER et al. 1984). Die Aktivität der Enzyme zwischen CHI und CGT, nach GA_3-Gabe, konnte indirekt durch die erfolgreiche Supplementation mit Flavonoiden demonstriert werden. Der Einbau erfolgte sehr rasch, eine eventuelle Induktion der Enzyme durch die Flavonoide kann aber nicht ausgeschlossen werden. Eine gemeinsame Steuerung der Gruppe II-Enzyme über eine Substratregulation wäre möglich. Die Enzymaktivitäten würden dann der CHS folgend, sukzessive gedrosselt bzw. erhöht werden.

5. Zur Wirkung der Gibberellinsäure

Die Dosisabhängigkeit der GA_3-Wirkung auf die CHS wurde um mehr als zwei Größenordnungen zu geringeren Konzentrationen hin verschoben, wenn GA_3 erst Mitte der Kulturperiode zugesetzt wurde, im Vergleich zu einer Zugabe beim Start der Kultur. Damit kam man in Konzentrationsbereiche, die auch bei Kalluskulturen dosisabhängige Wirkung erzielten

(SCHMITZ und SEITZ 1972).
Daraus wurde gefolgert, daß die Kultur in einer bestimmten Phase kompetent für GA_3 war. Dieser Zeitpunkt lag vor der Differenzierungsphase, also vor dem Anstieg der Enzymaktivitäten von PAL (relatives Maximum) CHS und CHI. Auf Grund der Instabilität der GA_3 im Nährmedium oder durch Metabolisierung in den Zellen, erhält man bei den Experimenten mit GA_3- Zugabe zum Start der Kultur eine Dosisabhängigkeit bei höheren Konzentrationen. Zum entscheidenden Zeitpunkt (7. Tag), war dann einfach viel weniger Gibberellin vorhanden als ursprünglich zugegeben. In neueren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß GA_3 als natürliches Gibberellin in Höheren Pflanzen eine geringe Rolle spielt. WEILER und WIECZOREK (1981) konnten keine Änderung des GA_3-Gehaltes in keimenden Gersten-Karyopsen feststellen. Spätere Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, daß GA_4, im Verlauf der Keimung von der Aleuronschicht gebildet, das entscheidende Gibberellin für die Induktion der α-Amylase darstellte. Die Induktion durch exogenes Gibberellin wurde indirekt über Stimulierung der GA_4-Synthese vermittelt (ATZDORN und WEILER 1983). Pflanzliche Zellkulturen sind in Bezug auf Gibberelline autonom. Die Nährmedien enthalten üblicherweise nur Auxin und Cytokinin als Phytohormone. Die von Tabak-Zellkulturen synthetisierten Gibberelline wurden von PARK et al. (1983) identifiziert. GA_3 wurde nicht nachgewiesen.
Da die Versuche mit GA_3 über relativ lange Zeiträume durchgeführt wurden, ist eine indirekte GA_3-Wirkung über die Induktion eines anderen Gibberellins nicht auszuschließen.

Mit Suspensionskulturen von Spinat wurde die Aufnahme von GA_1 untersucht (NOUR und RUBERY 1984). Die Aufnahme setzte sich zusammen aus einem Diffusionsanteil und einer Carrier vermittelten Komponente. Beide Anteile sind abhängig von einem pH-Gradienten. Der Carrier-Transport hatte ein pH-Optimum von 4,0 und eine K_m von 0,3 µM. Der Carrier transportierte GA_3 in gleicher Weise wie GA_1.

Die Aufnahme von GA_1 durch Diffusion erfolgt in der ungeladenen Form. Es ist also anzunehmen, daß GA_3 von den Karottenzellen rasch aufgenommen wurde. Selbst wenn kein Carrier-System in *Daucus carota* vorhanden sein sollte, erfolgt trotzdem eine effektive Aufnahme allein durch die Verteilung der schwachen Säure auf Grund des pH-Gradienten. Der pH des Kulturmediums beträgt zu Beginn der Kultur etwa 5,0. Erst gegen Ende der Kulturperiode (14 d) steigt der pH-Wert auf Werte von 6,5 - 7,0 an. Sowohl bei der GA_3 Gabe am 0. Tag, als auch am 7. Tag, war ein ausreichender ΔpH für eine Aufnahme der GA_3 vorhanden.
Ein weiteres Transportsystem für GA_1 wurde am Tonoplasten von *Vigna sinensis* nachgewiesen (KEITH et al. 1982). Die Aufnahme in die Vakuole war abhängig von MgATP, das pH-Optimum betrug 7,0 und die Affinität war sehr hoch (K_m=0,17 µM).
Der Transport der Gibberelline hat gewisse Ähnlichkeit mit dem Transport von IAA. Bei diesem Hormon wurde ebenfalls eine ΔpH getriebene Aufnahme (Diffusion) angenommen und es wurde auch ein Transportsystem am Tonoplasten gefordert. Sowohl für die Aufnahme in Vakuolen, als auch für den Carrier-vermittelten Efflux am Plasmalemma, wurde ein Ca^{2+}-antiport postuliert. Dieser Transportmechanismus der IAA wurde als ein Modell für die Wirkung vorgeschlagen (HERTEL 1983).
Die Signalsequenz von GA_3 bis zur Hemmung der CHS ist völlig unbekannt. Ausgehend von der Vorstellung, daß Ca^{2+} eine mögliche "Second messenger"-Funktion bei Phytohormonwirkungen besitzt (MARMÉ 1982) wurde versucht, ob sich auch in Zusammenhang mit der GA_3-Wirkung Hinweise für eine Beteiligung von Ca^{2+} ergeben.
Eine Ca^{2+}-Beteiligung wurde für die GA_3-Wirkung bei der Gersten-Karyopse nachgewiesen (JONES und JACOBSEN 1983, OBATA et al. 1983, ELLIOTT et al. 1983).
Der β-Glucan-Elicitor aus *Phytophtera megasperma* der in Zellkulturen der Sojabohne die Phytoalexinsynthese indu-

ziert, erwies sich als Inhibitor des mikrosomalen Ca^{2+}-Transportes (MARMÉ 1982)
Mit La^{3+} und A 23 187 wurde versucht, die Ca^{2+}-Konzentration im Cytoplasma der Suspensionszellen zu stören. Mit La^{3+} konnten die Enzyme PAL und CHS kurzfristig stark gehemmt werden. Die Hemmung betrug 60-70 %, was auf eine völlige Sistierung der Enzymsynthese schließen läßt. Eine Interpretation dieser Ergebnisse ist schwierig, da die Wirkung von La^{3+} auf Ca^{2+}-Konzentrationen der Zellkomparitmente und auf Ca^{2+}-abhängige Prozesse unbekannt war. Bei der Verwendung des Ca^{2+}-Ionophors, kann man dagegen sicher sein, daß sich mit steigender Ionophormenge die Ca^{2+}-Konzentration im Cytoplasma erhöht, auf Grund hoher Ca^{2+}-Konzentrationen im Außenmedium. In der Kulturphase in der die Zugabe des Ionophors erfolgte, besaß das Kulturmedium eine Ca^{2+}-Konzentration von etwa 1,5 mM (JANNASCH 1984). Eine Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration hatte nach 24 h eine Steigerung der PAL-Aktivität bei gleichzeitiger Hemmung der CHS-Aktivität bewirkt, also ein ähnliches Verhalten wie bei Infektion, Verdünnung und L-AOPP. Eine weitere Steigerung der Ca^{2+}-Konzentration im Cytoplasma führte dann zu einer Hemmung beider Enzyme. Anschließende Untersuchungen von JANNASCH (1984) hatten zeigen können, daß die PAL-Aktivität auch durch $LaCl_3$ gesteigert werden konnte, sowohl beim relativen Maximum am 10. Tag als auch bei Verdünnungseffekt. Die Induktion der PAL durch Verdünnung konnte auch durch exogenes Ca^{2+} gesteigert werden.
Die bereits vermutete Umschaltung des Sekundärstoffwechsels in unbekannte Richtung, könnte durch Ca^{2+} vermittelt werden. Ob die GA_3-Wirkung, die über die Reduzierung der CHS-Aktivität den Flavonoid-Stoffwechsel blockiert, ohne daß dabei die PAL induziert wird, über Ca^{2+} vermittelt ist, kann zum gegenwärtigen Stand der Untersuchungen nicht entschieden werden. Dazu muß noch erwähnt werden, daß GA_3 die Aufnahme und Abgabe von Ca^{2+}

in Suspensionszellen von *Daucus carota* deutlich vermindert hatte (GROSS, persönliche Mitteilung). Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob diese GA_3-Wirkung am Anfang der Signalkette liegt, also vor der Wirkung auf den Flavonoid-Stoffwechsel, oder am Ende und sekundär erfolgt.

Die GA_3-Wirkung auf den Flavonoid-Stoffwechsel scheint eher im Zusammenhang mit der Differenzierung von pigmentierten Zellen zu stehen, als mit der raschen Umschaltung des Stoffwechsels bei Infektion oder Streß (Verdünnung). Möglich wäre, daß der endogene Gibberellin-Spiegel in der Pflanze, während einer bestimmten Entwicklungsphase, verantwortlich ist für die Differenzierung Anthocyan-akkumulierender Zellen, Zellschichten oder Organe. Die Heterogenität der Karottenkulturen hinsichtlich Pigmentierung sowie das Nachlassen der Fähigkeit zur Anthocyansynthese, könnten ebenfalls durch endogene Gibberelline gesteuerte Prozesse sein.

6. Vorkommen und Bedeutung der 3'-Nucleotidase in Höheren Pflanzen

Die Hydrolyse von 3'-Nucleotiden kann in Pflanzen durch drei Typen von Enzymen erfolgen (WILSON 1975):

1. Unspezifische Phosphomonoesterasen
2. Nuclease I (EC. 3.1.4.9.)
3. 3'-Nucleotidase (EC. 3.1.3.6.)

Als Beispiel einer unspezifischen Phosphomonoesterase in Pflanzen ist die "saure Phosphatase"(EC. 3.1.3.2.) zu nennen. Dieses Enzym besitzt ein pH-Optimum im sauren pH-Bereich und eine geringe Spezifität. Das Enzym aus Erbsen trennt 5'- und 3'-Phosphatgruppen von Nucleotiden und spaltet Phosphoenolpyruvat sowie p-Nitrophenylphosphat (FORTI et al. 1961).

Eine spezifische 3'-Nucleotidase-Aktivität wurde erstmals in *Lolium multiflorum* entdeckt. Das Enzym besitzt eine hohe Spezifität für die 3'-Phosphatgruppe und eine geringere gegenüber dem Nucleosid. Das pH-Optimum liegt bei 7,5.

Die 3'-Nucleotidase wird gehemmt durch SH-Gruppen, Cyanid und anorganisches Phosphat (SHUSTER und KAPLAN 1953). In vielen Fällen konnte die 3'-Nucleotidase-Aktivität nicht getrennt werden von einer Ribonuclease-Aktivität, sodaß auf ein einziges Protein geschlossen wurde (LORING et al. 1966). In späteren Untersuchungen wurde gezeigt, daß es sich dabei um ein Enzym handelt, das sowohl die Hydrolyse von RNA und DNA, als auch die von 3'-Nucleotiden katalysiert. Dieses Enzym wurde als Nuclease I (pflanzliche) bezeichnet und wirkt als Endonuclease, die 5'-Nucleotide freisetzt, und besitzt keine Spezifität für die Zucker der Nucleinsäuren (WILSON 1975). Die 3'-Nucleotidase-Aktivität der Nuclease I aus *Phaseolus aureus* besitzt ähnliche Eigenschaften wie die bereits erwähnte 3'-Nucleotidase aus *Lolium multiflorum* (LORING et al. 1966). 3'-Nucleotidase-Aktivität wurde in Samen, Keimlingen und Blättern zahlreicher Gräser nachgewiesen (SHUSTER und KAPLAN 1953), aber auch in Zellkulturen von Tabak (OLESON 1976) und *Catharanthus roseus* (HIROSE und ASHIHIRA 1984). Während der Keimung von Gerste steigt die Aktivität um das 10fache an (SHUSTER 1957). In *Lolium multiflorum* bleibt die Aktivität während der Keimung konstant und steigt erst im Verlauf der späteren Entwicklung an. Die Rolle des Enzyms bei der Keimung war unklar (COHEN und GOODWIN 1961). Die Hauptfunktion der Nuclease I ist der Abbau von Nucleinsäuren (WILSON 1975). Dagegen ist die Funktion der 3'-Nucleotidase ohne Nuclease-Aktivität nicht geklärt. Sie könnte den Abbau von RNA durch RNAsen ergänzen (WILSON 1975) und bei der Rückgewinnung von Purinen (HIROSE und ASHIHARA 1984) und Pyrimidinen (KANAMORI-FUKUDA et al. 1981) beteiligt sein. Da die 3'-Nucleotidase auch CoA-SH als Substrat akzeptiert (SHUSTER und KAPLAN 1953) könnte auch eine Beteiligung des Enzyms beim Abbau von CoA-SH bzw. Acyl-CoA-Verbindungen vermutet werden. NEGREL und SMITH (1983) fanden einen raschen Abbau von Cinnamoyl-CoA-Verbindungen in Extrakten der Gerste. Der erste Schritt war dabei die 3'-Dephosphorilierung.

Bei der aus *Daucus carota* Suspensionskulturen isolierten 3'-Nucleotidase-Aktivität handelte es sich eindeutig um eine spezifische 3'-Nucleotidase. Es wurden auch unspezifische Phosphomonoesterasen getrennt, die aber bei der Hemmung der CHS keine Rolle gespielt haben. Bei der als 3'-Nucleotidase identifizierten Hemmaktivität, könnte es sich aber auch um die Nuclease I gehandelt haben. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, welches der beiden Enzyme vorliegt und welchem Zellkompartiment die Aktivität zugeordnet werden kann. Der gegenwärtige Stand der Untersuchungen erlaubt keine Schlüsse auf eine mögliche Beteiligung dieses Enzyms beim Metabolismus von CoA-Verbindungen bzw. einer Regulation des Sekundärstoffwechsels.

V ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkung von GA_3 auf die Enzyme des Anthocyanstoffwechsels wurde untersucht. Dabei stand die Regulation der CHS im Vordergrund. Dieses Enzym wurde ausführlich charakterisiert. Ein in Mischexperimenten nachgewiesenes, die CHS-Reaktion spezifisch hemmendes Protein, wurde identifiziert und der Mechanismus der Hemmung aufgeklärt. Die Differenzierung des Blütenstandes der Wilden Möhre in Anthocyan-haltige und Anthocyan-freie Blüten wurde auf der Basis extrahierbarer Enzymaktivitäten untersucht. Die CHS aus Blüten wurde hinsichtlich Substratspezifität charakterisiert.

1. Eine anthocyanproduzierende Suspensionskultur wurde im Hinblick auf Wachstum, Protein- und Anthocyangehalte, sowie Enzymaktivitäten von PAL, CHS und CHI charakterisiert. Die Maxima der Enzymaktivitäten lagen 2 d vor maximaler Anthocyanakkumulation. Wachstum und Anthocyansynthese erfolgen in verschiedenen Phasen der Kultur.

2. Die Hemmung der Anthocyansynthese durch GA_3 in *Daucus carota* Gewebekulturen kommt durch Ausfall der CHS-Aktivität zustande. Dieses Enzym reagierte dosisabhängig und rasch auf GA_3. Die Enzyme PAL und CHI wurden durch GA_3 ebenfalls gehemmt aber in geringerem Maße. Kurzfristig erzeugte GA_3 einen physiologischen Block auf dem Niveau der CHS. Die Aktivität der übrigen Enzyme der Gruppe II konnte durch Supplementation der Anthocyansynthese mit verschiedenen Flavonoiden demonstriert werden. Dabei wurde auch eine 3'-Hydroxylierung auf der Flavonoidstufe nachgewiesen. Die CHS ist die limitierende Aktivität der Anthocyansynthese in Kulturen von *Daucus carota*.

3. Die Wirkung von GA_3 auf Wachstum, Protein- und Wassergehalte der Zellen war sehr gering. Die G6PDH wurde durch GA_3 nicht beeinflußt. Dagegen war die Gesamt-Phosphatase-Aktivität unter GA_3 reduziert. Die Analyse

der freien Aminosäuren zeigte eine Abnahme für die meisten Aminosäuren mit GA_3, als einzige Aminosäure hatte Phenylalanin geringfügig zugenommen.
Die Kultur besitzt für GA_3 eine kompetente Phase, die vor der Differenzierungsphase liegt (7. Tag). Zu diesem Zeitpunkt wird die CHS-Aktivität durch GA_3 empfindlich reduziert. Die Dosisabhängigkeit war um ca. 2 Größenordnungen zu geringeren Konzentrationen hin verschoben, im Vergleich zur GA_3-Gabe beim Start der Kultur. Bei 0,3 µM GA_3 betrug die CHS-Aktivität nur noch 25 %.

4. Eine Blockierung der PAL in vivo mit L-AOPP führte zu einem 3 fachen Gehalt an freiem Phenylalanin und zu einer fast totalen Hemmung der Anthocyansynthese. Neben Phenylalanin waren noch andere Aminosäuren beeinflußt. Absolut gesehen nahmen Glutamin und Asparagin am stärksten zu. Durch L-AOPP wurde die PAL-Aktivität induziert und die CHS- und CHI-Aktivitäten vermindert. Eine Substratregulation der CHS konnte daraus nicht abgeleitet werden, da auch unter anderen induktiven Bedingungen für die PAL, die CHS-Aktivität reduziert wurde.

5. Störung des Ca^{2+}-Stoffwechsels der Zellen durch $LaCl_3$ führte kurzfristig zu einem starken Absinken der Aktivitäten von PAL und CHS. Eine Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration im Cytoplasma durch den Einsatz des Ionophors A 23 187 erhöhte die PAL- und verminderte die CHS-Aktivität. Diese Art der Regulation der beiden Schlüsselenzyme trat auch auf bei Infektion und Verdünnung.

6. Bei der Differenzierung innerhalb der Möhren-Dolde in eine anthocyanhaltige Zentralblüte und weiße Randblüten ist die CHS das entscheidende Enzym. Sie war in Extrakten aus weißen Blüten weder als Aktivität noch als Protein nachweisbar (PAP-Methode). Dagegen enthielten Extrakte aus violetten Blüten hohe CHS-Aktivitäten und nachweisbares CHS-Protein. Die PAL-Aktivität war in beiden Blütentypen etwa gleich. Die CHI-Aktivität war in weißen Blüten geringer aber deutlich meßbar. Die CHS

aus Blüten konnte nur in Gegenwart von BSA gemessen werden. In ihrem Substratverhalten stimmte sie überein mit der CHS aus Suspensionskulturen.

7. Die CHS aus Suspensionskulturen wurde 34,5 fach gereinigt bei einer Ausbeute von 68 %. Der pI wurde näherungsweise bestimmt als 5,3. Für die Untereinheit des Enzyms wurde ein MG von 43 000 ermittelt.
Die Stabilisierung der Aktivität während der Reinigung gelang durch Entzug von ME und schrittweises Absenken des pH-Wertes auf 6,5. Während der Lagerung (-70 °C) erwiesen sich hohe Proteinkonzentrationen als günstig für die Stabilität. Im Test erfolgte eine Stabilisierung durch kombinierten Einsatz von ME und BSA. Besonders BSA erwies sich dabei als hervorragendes Hilfsmittel, denn im Gegensatz zu ME förderte es nicht die Bildung von Nebenprodukten. Die Wirkungen von ME und BSA waren synergistisch.
Die partiell gereinigte CHS ist charakterisiert durch unterschiedliche pH-Optima für die Naringenin-Bildung (7,9) und Eriodictyol-Bildung (6,8). Sie besitzt eine hohe Spezifität für 4-Cumaroyl-CoA (K_m=0,6 µM). Caffeoyl-CoA (K_m=7,7 µM) wird nicht als natürliches Substrat der CHS angesehen. Das Enzym wurde in vitro gehemmt durch Naringenin, Naringeninchalcon, CoA-SH, Acetyl-CoA und 3'-DP-Malonyl-CoA. Substrathemmung wurde beobachtet für 4-Cumaroyl-CoA (>10 µM) und Malonyl-CoA (>50 µM). Die Hemmung mit Naringenin war unkompetitiv. Mit Auftreten einer zweiten Hydroxylgruppe in 3'-Position verliert das Flavanon (bzw. Chalcon) seine Hemmaktivität. CoA-SH verliert nach Dephosphorilierung ebenfalls an Hemmaktivität. 3'-DP-Malonyl-CoA war der effektivste Inhibitor mit 50 % Hemmung bei 3 µM. 3'-DP-Malonyl-CoA und Malonyl-4'-phosphopantethein besitzen keine Substrataktivität im CHS-Test. Dagegen wurden 3'-DP-4-Cumaroyl-CoA und 4-Cumaroyl-4'-phosphopantethein als Substrate akzeptiert.

Die CHS aus *Daucus carota* unterscheidet sich von der CHS aus Petersilie durch eine wesentlich kleinere K_m für Malonyl-CoA (3,0 µM) und durch die Tatsache, daß Pantethein keine Hemmaktivität besaß.

8. Die CHS aus *Daucus carota* Suspensionskulturen konnte in Präparationen isolierter Vakuolen nachgewiesen werden. Auf Grund der Verteilung der Aktivität wurde auf eine Lokalisation der CHS in vivo, an der cytoplasmatischen Seite des Tonoplasten geschlossen. Ein gewisser Teil der CHS-Aktivität (15 %) blieb auch nach Homogenisation von Protoplasten membrangebunden. Bei der Isolation von Vakuolen wurde bis zu 74 % der CHS-Aktivität einer entsprechenden Protoplastenmenge mitisoliert. Nach Homogenisation der Vakuolen war die CHS-Aktivität nahezu vollständig löslich. Die Bindung von CHS an die Vakuolenmembran war relativ schwach. Für die Enzyme CHI und PAL konnten weder eine Membran-assoziierte Aktivität, noch signifikante Aktivität in Vakuolenfraktionen nachgewiesen werden. Damit wurde zum ersten Mal eine Enzymaktivität der Anthocyan-Biosynthese an Vakuolen lokalisiert.

9. Mit Extrakten aus anthocyanfreien Suspensionszellen (GA_3-Dauerbehandlung) trat in Mischexperimenten im CHS-Test eine starke Hemmung auf. Diese Hemmaktivität wurde partiell gereinigt und als spezifische 3'-Nucleotidase identifiziert. Dieses Enzym hydrolysierte 3'-Nucleotide, darunter auch CoA-SH und Acyl-CoA-Thioester. Bestes Substrat war 3'-AMP. Mit CoA-SH als Substrat wurde ein pH-Optimum von 7,0 ermittelt. Die Hemmung der CHS-Reaktion kommt dadurch zustande, daß Malonyl-CoA nach Dephosphorilierung seine Substrataktivität verliert und als wirksamer Inhibitor agiert. Die Hemmung war reversibel. Die 3'-Phosphatgruppe von Malonyl-CoA ist essentiell für die CHS-Reaktion.

10. Es konnte keine Verbindung hergestellt werden zwischen der schnellen GA_3-Wirkung auf die CHS und einem Auftreten von 3'-Nucleotidase-Aktivität. Schwierigkeiten wurden verursacht durch unspezifische Phosphatasen, die die 3'-Nucleotidase-Aktivität maskierten. Die Trennung der 3'-Nucleotidase von anderen Phosphatasen gelang nur durch Reinigung auf Hemmaktivität im CHS-Test mit Protein aus GA_3-dauerkultivierten Kulturen. Ungeklärt blieb auch, ob durch GA_3 eine posttranslationale Regulation der CHS (erhöhter Abbau, Inaktivierung) erfolgt oder ob GA_3 eine Sistierung der Synthese des Enzyms bewirkt.

VI LITERATURVERZEICHNIS

ADAMS,P.A.,ROSS,M.A. (1983): Interaction of indolacetic acid and gibberellic acid in the short-term growth kinetics of oat stem segments. Plant Physiol. 73, 566-568

ALBERTS,A.W.,BELL,R.M.,VAGELOS,P.R. (1972): Acyl carrier protein. XV. Studies of β-ketoacyl-acyl-carrier protein synthetase. J.Biol.Chem. 247, 3190-3198

ALFERMANN,W.,REINHARD,E. (1971): Isolierung anthocyanhaltiger und anthocyanfreier Gewebestämme von *Daucus carota*: Einfluß von Auxinen auf die Anthocyanbildung. Experientia 27, 353-354

ANDERSON,J.M.,CHARBONNEAU,H.,JONES,H.P.,McCANN,R.O.,CARMIER,M.J. (1980): Characterization of the plant nicotinamide adenine dinucleotide kinase activator protein and its identification as calmodulin. Biochemistry 19, 3113-3120

ATZDORN,R.,WEILER,E.W. (1983): The role of endogenous gibberellins in the formation of α-amylase by aleurone layers of germinating barley caryopses. Planta 159, 289-299

BANYAL,S.,RAI,V.K. (1983): Reversal of osmotic stress by gibberellic acid in *Brassica campestris*. Recovery of hypocotyl growth, protein and RNA levels in the prescence of GA. Physiol.Plant. 59, 111-114

BARZ,W.,WIERMANN,R. (1982): Recent aspects of flavonoid biosynthesis and degradation in plants. In: Flavonoids and bioflavonoids. 185-210, eds.: FARKAS,L. et al., Elsevier,Amsterdam

BELL,J.N.,DIXON,R.A.,BAILEY,J.A.,ROWELL,P.M.,LAMB,C.J. (1984): Differential induction of chalcone synthase mRNA activity at the onset of phytoalexin accumulation in compatible and incompatible plant-pathogen interactions. Proc.Natl.Acad.Sci. 81, 3384-3388

BERGMEYER,H.U. (1970): Methoden der enzymatischen Analyse. Bd.1, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim

BLAKELEY,S.D.,THOMAS,B.,HALL,J.L.,VINCE-PRUE,D. (1983): Regulation of swelling of etiolated wheat-leaf protoplasts by phytochrome and gibberellic acid. Planta 158, 416-421

BLOCH,K.,VANCE,D. (1977): Control mechanism in the synthesis of saturated fatty acids. Ann.Rev.Biochem. 46, 263-298

BOUDET,A.M. (1981): Biosynthesis and metabolism of cinnamate esters. In: The biochemistry of phenolic compounds in higher plants. 31.Konf. d. Ges. f.Biologische Chemie, Saigerhö/Schwarzwald 5.-9.Okt.1980. Hoppe Seyler's Z. Physiol.Chem. 362, 1-16

BRADFORD,M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt.Biochem. 72, 248-254

BRAUN,G.,SEITZ,U. (1975): Verlauf der Akkumulation von Kaffee-, Ferula- und Chlorogensäure in Beziehung zur Cyanidinakkumulation bei zwei Zellinien von *Daucus carota*. Biochem.Physiol.Pflanzen 168, 93-100

BRITSCH,L.,HELLER,W.,GRISEBACH,H. (1981): Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley. Z.Naturforsch. 36c, 742-750

COHEN,R.Z.,GOODWIN,T.W. (1961): 3'-Nucleotidase activity of rye grass seeds. Phytochemistry 1, 47-51

CROZIER,A. (1981): Aspects of the metabolism and physiology of gibberellins. Adv.Bot.Research 9, 33-149

CZICHI,U.,KINDL,H. (1975): A model of closely assembled consecutive enzymes on membranes: Formation of hydroxycinnamic acids from L-phenylalanine on thylakoids of *Dunaliella marina*. Hoppe Seyler's Z. Physiol.Chem. 356, 475-485

CZICHI,U.,KINDL,H. (1977): Phenylalanine ammonia lyase and cinnamic acid hydroxylases as assembled consecutive enzymes on microsomal membranes of cucumber cotyledons: Cooperation and subcellular distribution. Planta 134, 133-143

DANGELMAYR,B. (1982): Nachweis von Enzymen der Flavonoidbiosynthese und der genetischen Kontrolle von Chalconisomerase-Aktivität in Blüten. Dissertation, Tübingen

DIETER,P.,MARMÉ,D. (1981): A calmodulin dependent ATPase from corn. FEBS Letters 125, 245-248

DOODEMAN,M.,TABAK,A.J.H.,SCHRAM,A.W.,BENNINK,G.J.H. (1982): Hydroxylation of cinnamic acids and flavonoids during biosynthesis of anthocyanins in *Petunia hybrida* Hort. Planta 154, 546-549

DOUGALL,D.K.,JOHNSON,J.M.,WHITTEN,G.H. (1980): A clonal analysis of anthocyanin accumulation by cell cultures of wild carrot. Planta 149, 292-297

DOUGALL,D.K., LaBRAKE,S.,WHITTEN,G.H. (1983a): The effects of limiting nutrients, dilution rate, culture pH, and temperature on the yield constant and anthocyanin accumulation of carrot cells grown in semicontinuous chemostat cultures. Biotechnol.Bioeng. 25, 569-579

DOUGALL,D.K.,LaBRAKE,S.,WHITTEN,G.H. (1983b): Growth and anthocyanin accumulation rates of carrot suspension cultures grown with excess nutrient after semicontinuous culture with different limiting nutrients at several dilution rates, pHs, and temperatures. Biotechnol.Bioeng. 25, 581-594

DOUGALL,D.K.,WHITTEN,G.H. (1980): The ability of wild carrot cell cultures to retain their capacity for anthocyanin synthesis after storage at -140°C. Planta Medica suppl.,129-135

EBEL,J.,HAHLBROCK,K. (1977): Enzymes of flavone and flavonol-glycoside biosynthasis. Coordinated and selective induction in cell-suspension cultures of *Petroselinum hortense*. Eur.J.Biochem. 75, 201-209

EBEL,J.,SCHMIDT,W.E.,LOYAL,R. (1984): Phytoalexin synthesis in soybean cells: Elicitor induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs and correlation with phytoalexin accumulation. Arch.Biochem.Biophys. 232, 240-248

ELLIOTT,D.C. (1983): Inhibition of cytokinin-regulated responses by calmodulin-binding compounds. Plant Physiol. 72, 215-218

ELLIOTT,D.C.,BATCHELOR,S.M.,CASSAR,R.A.,MARINOS,N.G. (1983): Calmodulin-binding drugs affect responses to cytokinin,auxin,and gibberellic acid. Plant Physiol. 72, 219-224

FORKMANN,G.,HELLER,W.,GRISEBACH,H. (1980): Anthocyanin biosynthesis in flowers of *Matthiola incana*. Flavanone 3- and flavonoid 3'-hydroxylases. Z.Naturforsch. 35c, 691-695

FORKMANN,G.,KUHN,B. (1979): Genetic control of chalcone isomerase activity in anthers of *Petunia hybrida*. Planta 144, 189-192

FORTI,G.,TOGNOLI,C.,PARISI,B. (1962): Purification from pea leaves of a phosphatase that attacks nucleotides. Biochem.Biophys.Acta 62, 251-260

FRITSCH,H.,GRISEBACH,H. (1975): Biosynthesis of cyanidin in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. Phytochemistry 14, 2437-2442

FUISTING,K.,WEISSENBÖCK,G. (1980): "Flavanone synthase" in oat primary leaves. Time course and distribution at the tissue and subcellular level. Z. Naturforsch. 35c, 973-977

FURUYA,M.,THIMANN,K.V. (1964): The biogenesis of anthocyanins. XI. Effects of gibberellic acid in two species of *Spirodela*. Arch.Biochem.Biophys. 108, 108-116

GRAEBE,J.E. (1982): Gibberellins biosynthesis in cell-free systems from higher plants. In: Plant growth substances 1982. 71-80, ed.: WAREING,P.F., Academic press, New York

GRAZIANA,A.,RANJEVA,R.,BOUDET,A.M. (1983): Provoked changes in cellular calcium controlled protein phosphorilation and activity of quinate:NAD^+ Oxidoreductase in carrot cells. FEBS Letters 156, 325-328

GREGOR,H.D. (1974): Einfluß von Gibberellinsäure (GA_3) auf die PAL-Aktivität und die Synthese von Phenylpropanderivaten in Zellkulturen von *Haplopappus gracilis*. Protoplasma 80, 273-277

GRISEBACH,H. (1977): Biochemistry of lignification. Naturwiss. 64, 619-625

GRISEBACH,H. (1981): Biosynthesis of lignin. In: The biochemistry of phenolic compounds in higher plants. 31.Konf.d.Ges.f.Biologische Chemie, Saigerhö/Schwarzwald 5.-9.Okt.1980. Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 362, 1-16

GRISEBACH,H.,PATSCHKE,L.(1961): Zur Biogenese der Flavonoide. IV.Mitt. 2',4,4',6 Tetrahydroxychalkon 2'-glucosid-(β-^{14}C) als Vorstufe für Quercetin und Cyanidin. Z.Naturforsch. 16b, 645-647

GROSS,G.G. (1981): The hydroxycinnamate pathway. In: The biochemistry of phenolic compounds in higher plants. 31.Konf.d.Ges.f.Biologische Chemie, Saigerhö/Schwarzwald 5.-9.Okt.1980. Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 362, 1-16

HAGMANN,M.-L.,HELLER,W.,GRISEBACH,H. (1983): Induction and characterization of a microsomal flavonoid 3'-hydroxylase from parsley cell cultures. Eur.J.Biochem. 134, 547-554

HAHLBROCK,K. (1977): Regulatory aspects of phenylpropanoid biosynthesis in cell cultures. In: Plant tissue cultures and its biotechnological application. 95-111, eds: BARZ,W. et al.,Springer Verlag, Berlin

HAHLBROCK,K. (1981): Messenger RNA induction as a prerequisite for flavonoid biosynthesis in parsley. In: The biochemistry of phenolic compouns. 31.Konf.d.Ges.f.Biologische Chemie, Saigerhö/Schwarzwald 5.-9.Okt.1980. Hoppe Seyler's Z. Physiol.Chem. 362, 1-16

HAHLBROCK,K.,KNOBLOCH,K.-H.,KREUZALER,F.,POTTS,J.R.M.,WELLMANN,E. (1976): Coordinated induction and subsequent activity changes in two groups of metabolically interrelated enzymes. Light-induced synthesis of flavonoid-glycosides in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. Eur.J.Biochem. 61, 199-206

HAHLBROCK,K.,LAMB,C.J.,PURWIN,C.,EBEL,J.,FAUTZ,E.,SCHÄFER,E. (1981): Rapid response of suspension-cultured parsley cells to the elicitor from *Phytophtera megasperma* var.*sojae*. Induction of the enzymes of general phenylpropanoid metabolism. Plant Physiol. 67, 768-773

HARBORNE,J.B. (1976): A unique pattern of anthocyanins in *Daucus carota* and other umbelliferea. Biochem.System.Ecol. 4, 31-35

HARBORNE,J.B. (1983): Identification of the major anthocyanin of carrot cells in tissue culture as cyanidin 3-(sinapoylxylosylglucosyl-galactoside). Z.Naturforsch. 38c, 1055-1056

HARDING,V.K.,HEALE,J.B. (1980): Isolation and identification of the antifungal compounds accumulating in the induced resistance response of carrot root slices to *Botrytis cinerea*. Physiol. Plant Path. 17, 277-289

HEINZMANN,U. (1976): Regulation der Enzyme des Flavonoid-Stoffwechsels bei einer anthocyanfreien und einer anthocyanhaltigen Zellinie von *Daucus carota* Kallus. Dissertation, Tübingen

HEINZMANN,U.,SEITZ,U. (1974): Beziehung von Anthocyansynthese und Enzymaktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) bei Kalluskulturen von *Daucus carota*. Planta 117, 75-81

HEINZMANN,U.,SEITZ,U. (1977): Synthesis of phenylalanine ammonia-lyase in anthocyanin-containing and anthocyanin-free callus cells of *Daucus carota* L. Planta 135, 63-67

HEINZMANN,U.,SEITZ,U.,SEITZ,U. (1977): Purification and substrate specifities of hydroxycinnamate:CoA ligase from anthocyanin-containing and anthocyanin-free carrot cells. Planta 135, 313-318

HELLER,W. (1981): The flavonoid glycoside pathway in parsley. In: The biochemistry of phenolic compounds in higher plants. 31. Konf.d.Ges.f.Biologische Chemie, Saigerhö/Schwarzwald 5.-9. Okt.1980. Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 362, 1-16

HELLER,W.,EGIN-BÜHLER,B.,GARDINER,S.E.,KNOBLOCH,K.-H.,MATERN,U., EBEL,J.,HAHLBROCK,K. (1979): Enzymes of general phenylpropanoid metabolism and of flavonoid glycoside biosynthesis in parsley. Differential inducibility by light during growth of cell suspension cultures.Plant Physiol. 64, 371-373

HELLER.W.HAHLBROCK,K. (1980): Highly purified "flavanone synthase" from parsley catalyzes the formation of naringenin chalcone. Arch.Biochem.Biophys. 200, 617-619

HEMINGSON,J.C.,COLLINS,R.P. (1982): Anthocyanins present in cell cultures of *Daucus carota*. J.Nat.Prod. 45, 385-389

HERTEL,R. (1983): The mechanism of auxin transport as a model for auxin action. Z.Pflanzenphys. 112, 53-67

HESS,D. (1968) In: Biochemische Genetik. 86-106, Springer Verlag, Berlin

HILLE,A.,PURWIN,C.,EBEL,J. (1982): Induction of enzymes of phytoalexin synthesis in cultured soybean cells by an elicitor from *Phytophtera megasperma* f.sp.*glycinea*. Plant Cell Reports 1, 123-127

HINDERER,W. (1982): Regulation der Chalconsynthase durch einen Inhibitor bei anthocyanhaltigen Kalluszellen der Karotte. Diplomarbeit, Tübingen

HINDERER,W.,NOÉ,W.,SEITZ,H.U. (1983): Differentiation of metabolic pathways in the umbel of *Daucus carota*. Phytochemistry 22, 2417-2420

HINDERER,W.,PETERSEN,M.,SEITZ,H.U. (1984): Inhibition of flavonoid biosynthesis by gibberellic acid in cell suspension cultures of *Daucus carota* L. Planta 160, 544-549

HIROSE,F.,ASHIHARA,H. (1984): Changes in the activity of enzymes involved in purine "salvage" and nucleic acid degradation during the growth of *Catharanthus roseus* cells in suspension culture. Physiol.Plant. 60, 532-538

HOPP,W.,MOCK,H.-P.,SEITZ,H.U. (1983): Isolation of anthocyanin-containing vacuoles from protoplasts of a cell suspension culture of *Daucus carota*. In: Protoplasts 1983. Proceedings of the 6th Int.Protoplast Symposium, 188-189,Basel 1983, eds.: POTRYKUS et al.

HRAZDINA,G.,ALSCHER-HERMAN,R.,KISH,V.M., (1980): Subcellular localization of flavonoid synthesizing enzymes in *Pisum*, *Phaseolus*, *Brassica* and *Spinacia* cultivars. Phytochemistry 19, 1355-1359

HRAZDINA,G.,KREUZALER,F.,HAHLBROCK,K.,GRISEBACH,H. (1976): Substrate specificity of flavanone synthase from cell suspension cultures of parsley and structure of release products in vitro. Arch. Biochem.Biophys. 175, 392-399

HRAZDINA,G.,PARSONS,G.F. (1982): Induction of flavonoid synthesizing enzymes by light in etiolated pea (*Pisum sativum* cv. Midfreezer) seedlings. Plant Physiol. 70, 506-510

HRAZDINA,G.,WAGNER,G.J.,SIEGELMANN,H.W. (1978): Subcellular localization of enzymes of anthocyanin biosynthesis in protoplasts. Phytochemistry 17, 53-56

JACOBSEN,J.V.,CHANDLER,P.M.,ZWAR,J.A. (1982): Control of protein synthesis in barley aleurone layers by gibberellin. In: Plant growth substances 1982. 111-120, ed: WAREING,P.F., Academic press,New York

JANNASCH,M. (1984): Regulation des Sekundärstoffwechsels bei Zellsuspensionskulturen von *Daucus carota* L. Diplomarbeit, Tübingen

JONES,R.L. (1982): Gibberellin control of cell elongation. In: Plant growth substances 1982. 121-130, ed: WAREING,P.F.,Academic press, New York

JONES,R.L.,JACOBSEN,J.V. (1983): Calcium regulation of the secretion of α-amylase isoenzymes and other proteins from barley aleurone layers. Planta 158, 1-9

JONSSON,L.M.V.,DONKER-KOOPMAN,W.E.,UITSLAGER,P.,SCHRAM,A.W. (1983) : Subcellular localization of anthocyanin methyltransferase in flowers of *Petunia hybrida*. Plant Physiol. 72, 287-290

KAMSTEEG,J.,VAN BREDERODE,J.,VERSCHUREN,P.M., VAN NIGTEVECHT,G. (1981): Identification, properties and genetic control of p-coumaroyl-coenzyme A 3-hydroxylase isolated from petals of *Silene dioica*. Z.Pflanzenphys. 102, 435-442

KANAMORI-FUKUDA,I.,ASHIHARA,H.,KOMAMINE,A. (1981): Pyrimidine nucleotide biosynthesis in *Vinca roseus* cells: Changes in the activity of the de novo and salvage pathways during growth in a suspension culture. J.Exp.Bot. 32, 69-78

KAZAMA,H.,KATSUMI,M. (1983): Gibberellin-induced changes in the water absorption, osmotic potential and starch content of cucumber hypocotyls. Plant and Cell Physiol. 24, 1209-1216

KEITH,B.,KNUTH,M.,CLARK,C.,MATLIN,S.A.,RAPPAPORT,L. (1982): Regulation of uptake and compartimentation of gibberellin A_1 in cowpea (*Vigna sinensis*) leaf vacuoles. In: Plant growth substances 1982. 439-447, ed: WAREING,P.F., Academic press, New York

KNOBLOCH,K.-H.,BAST,G.,BERLIN,J. (1982): Medium and light-induced formation of serpentine and anthocyanins in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. Phytochemistry 21, 591-594

KOUKOL,J.,CONN,E.E. (1961): The metabolism of aromatic compounds in higher plants. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. J.Biol.Chem. 236, 2692-2698

KOUNDAL,K.R.,SHAWNEY,S.K.,SINNA,S.K. (1983): Oxidation of 2-mercaptoethanol in the presence of tris-buffer. Phytochemistry 22, 2183-2184

KRESZE,G.-B.,STEBER,L.,OSTERHELT,D.,LYNEN,F. (1977): Reaction of yeast fatty acid synthetase with iodoacetamide. 3. Malonyl-coenzyme A decarboxylase as product of the reaction of fatty acid synthetase with iodoacetamide. Eur.J.Biochem. 79, 191-199

KREUZALER,F.,HAHLBROCK,K. (1972): Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants: Formation of naringenin (5,7,4'-trihydroxy-flavanone) from p-coumaroyl coenzyme A and malonyl-coenzyme A. FEBS Letters 28, 69-72

KREUZALER,F.,HAHLBROCK,K. (1975a): Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants. Formation of bis-noryangonin(4-hydroxy-6(4-hydroxystyryl)2-pyrone) from p-coumaroyl-CoA and malonyl-CoA. Arch.Biochem.Biophys. 169, 84-90

KREUZALER,F.,HAHLBROCK,K. (1975b): Enzymic synthesis of an aromatic ring from acetate units. Partial purification and some properties of flavanone synthase from cell-suspension cultures of *Petroselinum hortense*. Eur.J.Biochem. 56, 205-213

KREUZALER,F.,LIGHT,R.J.,HAHLBROCK,K. (1978): Flavanone synthase catalyzes CO_2 exchange and decarboxylation of malonyl-CoA. FEBS Letters 94, 175-178

KREUZALER,F.,RAGG,H.,FAUTZ,E.,KUHN,D.N.,HAHLBROCK,K. (1983): UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. Proc.Natl.Acad.Sci. 80, 2591-2593

KREUZALER,F.,RAGG,H.,HELLER,W.,TESCH,R.,WITT,J.,HAMMER,D.,HAHLBROCK,K. (1979): Flavanone synthase from *Petroselinum hortense*. Molecular weight, subunit composition, size of messenger RNA, and absence of pantetheinyl residue. Eur.J.Biochem. 99, 89-96

KUHN,B.,FORKMANN,G.,SEYFFERT,W. (1978): Genetic control of chalcone-flavanone isomerase activity in *Callistephus chinensis*. Planta 138, 199-203

KUROSAKI,F.,NISHI,A. (1983): Isolation and microbial activity of the phytoalexin 6-methoxymellein from cultured carrot cells. Phytochemistry 22, 669-672

LÄCHELE,E.,LEHNER,F.,SEITZ,U. (1974): Aufnahme und Verarbeitung von ^{14}C-markierter Vorstufen der Anthocyane unter dem Einfluß von Gibberellinsäure A_3 bei Kalluskulturen von *Daucus carota*. Z.Pflanzenphys. 71, 375-383

LAMB,C.J. (1977): Trans-cinnamic acid as a mediator of the light-stimulated increase in hydroxycinnamoyl-CoA:quinate hydroxycinnamoyl transferase. FEBS Letters 75, 37-40

LAWTON,M.A.,DIXON,R.A.,HAHLBROCK,K.,LAMB,C.J. (1983a): Rapid induction of the synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and of chalcone synthase in elicitor-treated plant cells. Eur.J.Biochem. 129, 593-601

LAWTON,M.A.,DIXON,R.A.,HAHLBROCK,K.,LAMB,C.J. (1983b): Elicitor induction of mRNA activity. Rapid effects of elicitor on phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNA activities in bean cells. Eur.J.Biochem. 130, 131-139

LIN,T.-I.,MORALES,M.F. (1977): Application of a one-step procedure for measuring inorganic phosphate in the presence of proteins: The actinomyosin ATPase system. Analyt.Biochem. 77, 10-17

LIPMANN,F.,TUTTLE,C. (1945): A specific micromethod for the determination of acyl phosphate. J.Biol.Chem. 159, 21-28

LORING,H.S.,McLENNAN,J.E.,WALTERS,T.L. (1966): Enzymes of nucleic acid metabolism from mung bean sprouts. II. The specificity of 3'-nucleotidase activity and general properties of the 3'-nucleotidase-ribonulease M_2 fraction. J.Biol.Chem. 241, 2876-2880

MANCINELLI,A.L. (1983): The photoregulation of anthocyanin synthesis. In: Encyclopedia of plants physiology. New series Vol.16B, 640-654, eds: SHROPSHIRE,W.,MOHR,H.,Springer Verlag, Berlin

MARGNA,U.,VAINJÄRV,T. (1983): Kinetin-mediated stimulation of accumulation of buckwheat flavonoids in the dark. Z.Naturforsch. 38c, 711-718

MARMÉ,D. (1982): The role of Ca^{2+} in signal transduction of higher plants. In: Plant growth substances 1982. 419-426, ed: WAREING, P.F., Academic press, New York

MATERN,U. (1981): Metabolism of malonyl-phenolglycosides in parsley. 31.Konf.d.Ges.f.Biologische Chemie, Saigerhö/Schwarzwald 5.-9. Okt.1980. Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 362, 1-16

MATILE,P. (1978): Biochemistry and function of vacuoles. Ann.Rev. Plant Physiol. 29, 193-213

McCLURE,J.W. (1975) in: The Flavonoids. S.1005, eds: HARBORNE,J.B. et al., Chapman and Hall, London

McCLURE,J.W. (1979): The physiology of phenolic compounds in plants. In: Biochemistry of plant phenolics. 525-556, eds: SWAIN,T. et al.,Plenum, New York

MOL.J.N.M.,SCHRAM,A.W.,DeVLAMING,P.,GERATS,A.G.M.,KREUZALER,F., HAHLBROCK,K.,REIF,H.J.,VELTKAMP,E. (1983): Regulation of flavonoid gene expression in *Petunia hybrida*: Description and partial characterization of a conditional mutant in chalcone synthase gene expression. Mol.Gen.Genet. 192, 424-429

MOUSTAFA,E.,WONG,E. (1967): Purification and properties of chalcone-flavanone isomerase from soya bean seed. Phytochemistry 6, 625-632

MURASHIGE,T.,SKOOG,F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol.Plant. 15, 473-497

NEGREL,J.,SMITH,T.A. (1984): The phosphohydrolysis of hydroxycinnamoyl-coenzyme A thioesters in plant extracts. Phytochemistry 23, 31-34

NOÉ,W. (1980): Anthocyanstoffwechsel bei Suspensionskulturen von *Daucus carota* L. Die Wirkung von L- α-Aminooxy- β-phenylpropionsäure (L-AOPP) und Gibberellinsäure (GA_3). Diplomarbeit, Tübingen

NOÉ,W. (1982): Regulation der Phenylalanin-Ammonium-Lyase bei anthocyanhaltigen Zellsuspensionskulturen von *Daucus carota* L. Dissertation,Tübingen

NOÉ,W.,LANGEBARTELS,C.,SEITZ,H.U. (1980): Anthocyanin accumulation and PAL-activity in a suspension culture of *Daucus carota* L. Inhibition by L-α-aminooxy-β-phenylpropionic acid and t-cinnamic acid. Planta 149, 283-287

NOÉ,W.,SEITZ,H.U. (1982): Induction of de novo synthesis of phenylalanine ammonia-lyase by L-α-aminooxy-β-phenylpropionic acid in suspension cultures of *Daucus carota* L. Planta 154, 454-458

NOÉ,W.,SEITZ,H.U. (1983a): Studies on the regulatory role of trans-cinnamic acid on the activity of the phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in suspension cultures of *Daucus carota* L. Z. Naturforsch. 38c, 408-412

NOÉ,W.,SEITZ,H.U. (1983b): Induction of mRNA activity for phenylalanine ammonia-lyase (PAL) by L-α-aminooxy-β-phenylpropionic acid, a substrate analogue of L-phenylalanine, in cell suspension cultures of *Daucus carota* L. FEBS Letters 146, 52-54

NOUR,J.M.,RUBERY,P.H. (1984): The uptake of gibberellin A_1 by suspension-cultured *Spinacia oleraceae* cells has a carrier mediated component. Planta 160, 436-443

OBATA,T. (1979): Final structure changes in barley aleurone layers during gibberellic acid-induced enzym secretion. Annals of Botany 44, 333-337

OBATA,T.,SUZUKI,H. (1976): Gibberellic acid-induced secretion of hydrolases in barley aleurone layers. Plant and Cell Physiol. 17, 63-71

OBATA,T.,TANIGUCHI,H.,MARUYAMA,Y. (1983): The effect of calmodulin antagonists on gibberellic acid-induced enzym secretion in barley aleurone layers. Annals of Botany 52, 877-883

OLESON,A.E. (1976): Inhibition of plant nuclease I by ATP and other nucleotides. Phytochemistry 15, 1203-1205

PARK,K.-H.,FUJISAWA,S.,SAKURAI,A.,YAMAGUCHI,I.,TAKAHASHI,N. (1983): Gibberellin production in cultured cells of *Nicotiana tabacum*. Plant and Cell Physiol. 24, 1241-1249

PETERSEN,M. (1983): Cyanidin-Glucosyltransferase-Aktivität und Anthocyanakkumulation bei Zellkulturen von *Daucus carota* L. Diplomarbeit, Tübingen

RALL,S. (1983): Charakterisierung von Anthocyanen und den Enzymen Phenylalanin-Ammonia-Lyase und Chalkonsynthase in verschiedenen Entwicklungsstadien definierter Genotypen von *Matthiola incana* R.Br. Dissertation, Tübingen

RAMMENSEE,G. (1981): Zur Frage der Isoenzyme der Hydroxyzimtsäure:CoA Ligase bei anthocyanhaltigen und anthocyanfreien Kalluskulturen von *Daucus carota* L. Diplomarbeit, Tübingen

RASMUSSEN,H. (1981): Calcium und cAMP as synarchic messengers. Wiley, New York

REED,P.W.,LARDY,H.A. (1972): A 23 187 a divalent cation ionophor. J. Biol.Chem. 247, 6970-6977

REID,P.D.,HAVIR,E.A.,MARSH,H.V.,Jr. (1972): L-phenylalanine ammonia-lyase (maize). Partial purification and response to gibberellic acid and cycloheximide of L-phenylalanine and L-tyrosine ammonia-lyase activities. Plant Physiol. 50, 480-484

REIMOLD,U.,KRÖGER,M.,KREUZALER,F.,HAHLBROCK,K. (1983): Coding and 3'-non-coding nucleotide sequence of chalcone synthase mRNA and assignement of amino acid sequence of the enzyme. EMBO-Journal 2, 1801-1805

RUSSELL,D.W.,CONN,E.E. (1967): The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings. Arch.Biochem.Biophys. 122, 256-258

SALEH,N.A.M.,FRITSCH,H.,KREUZALER,F.,GRISEBACH,H. (1978): Flavanone synthase from cell suspension cultures of *Haplopappus gracilis* and comparison with the synthase from parsley. Phytochemistry 17, 183-186

SASAKUMA,M.,OLESON,A.E. (1979): Partial purification and properties of nuclease I from barley malt. Phytochemistry 18, 1873-1874

SAUNDERS,J.A.,CONN,E.E.,LIN,C.H.,SHIMIDA,M. (1977): Localization of cinnamic acid 4-monooxygenase and the membrane-bound enzyme system for dhurrin biosynthesis in *Sorghum* seedlings. Plant Physiol. 60, 629-634

SAUNDERS,M.J.,HEPLER,P.K. (1983): Calcium antagonists and calmodulin inhibitors block cytokinin-induced bud formation in *Funaria*. Developmental Biol. 99, 41-49

SCHMELZER,E.,BÖRNER,H.,GRISEBACH,H.,EBEL,J.,HAHLBROCK,K. (1984): Phytoalexin synthesis in soybean (*Glycine max*). Similar time courses of mRNA induction in hypocotyls infected with a fungal pathogen and in cell cultures treated with fungal elicitor. FEBS Letters 172, 59-63

SCHMITZ,M.,SEITZ,U. (1972): Hemmung der Anthocyansynthese durch Gibberellinsäure A_3 bei Kalluskulturen von *Daucus carota*. Z. Pflanzenphysiol. 68, 259-265

SCHRÖDER,J.,HELLER,W.,HAHLBROCK,K. (1979a): Flavanone synthase: Simple and rapid assay for the key enzyme of flavonoid biosynthesis. Plant Sci. Lett. 14, 281-286

SCHRÖDER,J.,KREUZALER,F.,SCHÄFER,E.,HAHLBROCK,K. (1979b): Concomitant induction of phenylalanine ammonia-lyase and flavanone synthase mRNAs in irradiated plant cells. J.Biol.Chem. 254, 57-65

SCHRÖDER,J.,SCHÄFER,E. (1980): Radioiodinated antibodies, a tool in studies on the prescence and role of inactive enzyme forms: Regulation of chalcone synthase in parsley cell suspension cultures. Arch.Biochem.Biophys. 203, 800-808

SCHÜTZ,R.,HELLER,W.,HAHLBROCK,K. (1983): Substrate specificity of chalcone synthase from *Petroselinum hortense*. Formation of phloroglucinol derivates from aliphatic substrates. J.Biol. Chem. 258, 6730-6734

SEITZ,U.,REINHARD,E.: Cryopreservation of plant cell cultures. Proceedings from symposium on primary and secondary metabolism of plant cell cultures, 6.-8.Sept.1984, Rauischholzhausen, Springer Verlag, Berlin, (im Druck)

SEITZ,U.,RICHTER,G. (1970): Isolierung und Charakterisierung schnellmarkierter,hochmolekularer RNS aus frei suspendierten Callus-zellen der Petersilie (*Petroselinum sativum*). Planta 92, 309-326

SEYFFERT,W. (1982): Beiträge zur Genetik und Enzymologie der Flavanoide. Biol.Zbl. 101, 465-483

SHIRSAT,S.G.,NAIR,P.M. (1981): Biochemical mechanism for the inhibition of phenylalanine ammonia-lyase induction in the absence of oxygen in potato tuber tissue. Phytochemistry 20, 2315-2318

SHUSTER,L. (1957): Ryegrass nucleases. J.Biol.Chem. 229, 289-303

SHUSTER,L. (1958): The effect of pH on the inhibition of phosphatases by cyanide and cysteine. Arch.Biochem.Biophys.75, 345-351

SHUSTER,L.,KAPLAN,N.O. (1953): A specific b nucleotidase. J.Biol. Chem. 201, 535-546

SMITH,S.,STERN,A. (1983): The effect of aromatic CoA esters on fatty acid synthetase: Biosynthesis of ω-phenyl fatty acids. Arch. Biochem.Biophys. 222, 259-265

SPRIBILLE,R. (1982): Nachweis und Charakterisierung der Chalkonsynthase unter der Verwendung definierter Genotypen höherer Pflanzen. Dissertation, Tübingen

SPRIBILLE,R.,FORKMANN,G. (1981): Genetic cntrol of chalcone synthase activity in flowers of *Matthiola incana* R.Br. Z.Naturforsch. 36c, 619-624

SPRIBILLE,R.,FORKMANN,G. (1982a): Chalcone synthesis and hydroxylation of flavonoids in 3'-position with enzyme preparations from flowers of *Dianthus caryophyllus* L. (carnation). Planta 155, 176-182

SPRIBILLE,R.,FORKMANN,G. (1982b): Genetic control of chalcone synthase activity in flowers of *Antirrhinum majus*. Phytochemistry 21, 2231-2234

STEINITZ,B.,BERGFELD,R. (1977): Pattern formation underlying phytochrome-mediated anthocyanin synthesis in the cotyledons of *Sinapis alba* L. Planta 133, 229-235

STOBART,A.K.,KINSMAN,L.T. (1977): The hormonal control of betacyanin synthesis in *Amaranthus caudatus*. Phytochemistry 16, 1137-1142

STÖCKIGT,J.,ZENK,M.H. (1974): Enzymatic synthesis of chlorogenic acid from caffeoyl-coenzyme A and quinic acid. FEBS Letters 42, 131-134

STÖCKIGT,J.,ZENK,M.H. (1975): Chemical synthesis and properties of hydroxycinnamoyl-coenzyme A derivates. Z.Naturforsch. 30c, 352-358

STODDART,J.L. (1982): Gibberellin perception and its primary consequences: The current status. In: Plant growth substances 1982. 131-140, ed: WAREING,P.F., Academic press, New York

SÜTFELD,R.,KEHREL,B.,WIERMANN,R. (1978): Characterization,developement and localization of "flavanone synthase" in tulip anthers. Z.Naturforsch. 33c, 841-846

SÜTFELD,R.,WIERMANN,R. (1980): Chalcone synthesis with enzyme extracts from tulip anther tapetum using a biphasic enzyme assay. Arch.Biochem.Biophys. 201, 64-72

SÜTFELD,R.,WIERMANN,R. (1981): Purification of chalcone synthase from tulip anthers and comparison with the synthase from *Cosmos* petals. Z.Naturforsch. 36c, 30-34

TAKATA,M.,PICKARD,W.F.,LETTVIN,J.Y.,MOORE,J.W. (1966): Ionic conductance changes in lobster axon membrane when lanthanum is substituted for calcium. J.Gen.Physiol. 50, 461-471

TOMI,H.,SASAKI,Y.,KAMIKUBO,T. (1983a): Stimulation of in vitro RNA synthesis by DNA-loosley bound proteins treated with gibberellin A_3. Plant and Cell Physiol. 24, 1087-1092

TOMI,H.,SASAKI,Y.,KAMIKUBO,T. (1983b): Enhancement of template activity of chromatin in pea by gibberellic acid. Plant Sci. Lett. 30, 155-164

VARNER,J.E.,HO,D.T.H. (1975): The role of hormones in the integration of seedling growth. Symp.Soc.Dev.Biol. 34, eds: MARKERT,C.L., PAPACONSTANTINOU,J., Academic press, New York

VARTY,K.,ARREGUIN L.,B.,GÓMEZ T.,M.,LÓPEZ T.,P.J.,GÓMEZ L.,M.A. (1983): Effects of abscisic acid and ethylene on the gibberellic acid-induced synthesis of α-amylase by isolated wheat aleurone layers. Plant Physiol. 73, 692-697

WAGNER,G.J.,HRAZDINA,G. (1984): Endoplasmatic reticulum as a site of phenylpropanoid and flavonoid metabolism in *Hippeastrum*. Plant Physiol. 74, 901-906

WEILER,E.W.,WIECZOREK,U. (1981): Determination of femtomol quantities of gibberellic acid by radioimmuno assay. Planta 152, 159-167

WHITEHEAD,J.M.,DIXON,R.A. (1983): Chalcone synthase from cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*. Biochem.Biophys. Acta 747, 298-303

WIERMANN,R. (1981): Secondary plant products and cell and tissue differentiation. In: The biochemistry of plants, Vol. 7, 85-116, Academic press, New York

WIERMANN,R.,VIETH,K. (1983): Outer pollen wall, an important accumulation site for flavonoids. Protoplasma 118, 230-233

WILSON,C.M. (1975): Plant nucleases. Ann.Rev.Plant Physiol. 26, 187-208

YAMAKAWA,T.,KATO,S.,ISHIDA,K.,KODAMA,T.,MINODA,Y. (1983): Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture. Agric. Biol.Chem. 47, 2185-2191

YOMO,H.,VARNER,J.E. (1971): Hormonal control of a secretory tissue. In: Current topics in developement biology 6, 111-114, eds: MOSCONA,A.A.,MONROY,A., Academic press, New York

ZUCKER,M. (1965): Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. Plant Physiol. 40, 779-784

Bei Herrn Prof. Dr. H.U. Seitz bedanke ich mich herzlich für die hilfreiche Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung, die mir zuteil wurde.

Für viele Ratschläge im Hinblick auf Enzymreinigung bedanke ich mich bei meinem "Vorgänger" Dr. W. Noé.

Allen Laborkollegen unserer Arbeitsgruppe sei gedankt für vielfältige Diskussionen, Anregungen und Kooperationen (z.B. "Blütenernten").

Vielen weiteren Institutsangehörigen danke ich für methodische Betreuung, anregende Diskussionen und technische Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten:
Name: Hinderer, Walter Wilhelm
Geboren: 24.10.1952 in Göppingen
Eltern: Hinderer, August, Kaufmann und Hinderer, Waselena geb. Krainja
Verheiratet: 1979 - 1982
Sohn Boris, geb. 29.12.1980

Schulausbildung:

1959 - 1963	Grundschule in Göppingen
1963 - 1971	Freihof-Gymnasium in Göppingen
1971 - 1974	Mörike-Gymnasium in Göppingen
14. 6. 1974	Fachgebundene Hochschulreife

Studium:

1974 - 1976	Studium der Physik an der Universität Stuttgart
1976 - 1982	Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
10.10. 1978	Diplomvorprüfung in Biologie
1981 - 1982	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.U. Seitz
11. 8. 1982	Diplomprüfung in Biologie
1982 - 1984	Dissertation am Lehrstuhl für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.U. Seitz

Berufliche Tätigkeiten:

1980 - 1982	Wissenschaftliche Hilfskraft
1982 - 1984	Wissenschaftlicher Angestellter aus Mitteln der DFG

Meine akademischen Lehrer waren:

Apfelbach, Bardele, Bentrup, Braun, Bunke, Engels, Gaukler, Grell, Hadeler, Hager, Kulzer, Mayer, Möhres, Netzel, Oberwinkler, Poralla, Rähle, Rieker, Schief, Schwemmle, Seiler, Seitz, Seyffert, Strähle, Winkelmann, Zähner